





**TIRF-Mikroskopische Untersuchungen  
der Insulin-Granula und des Aktin-Zytoskeletts  
in primären Beta-Zellen und  
Untersuchung des zellulären Energiestoffwechsels  
mit PercevalHR**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Dennis Brüning  
aus Rheine

1. Referent:	Prof. Dr. Ingo Rustenbeck
2. Referentin:	Prof Dr. Simone Baltrusch
eingereicht am:	10.07.2019
mündliche Prüfung (Disputation) am:	15.11.2019
Druckjahr:	2019

---

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen:**

Brüning, D.; Reckers, K.; Drain, P.; Rustenbeck, I. Glucose but not KCl diminishes submembrane granule turnover in mouse beta cells. Journal of molecular endocrinology 59: 311–324 (2017).

Schumacher, K.; Matz, M.; Brüning, D.; Baumann, K.; Rustenbeck, I. Granule mobility, fusion frequency and insulin secretion are differentially affected by insulinotropic stimuli. Traffic 16: 493–509 (2015).

Schulze, T.; Morsi, M.; Brüning, D.; Schumacher, K.; Rustenbeck, I. Different responses of mouse islets and MIN6 pseudo-islets to metabolic stimulation: a note of caution. Endocrine 51: 440–447 (2016).

Schulze, T.; Morsi, M.; Reckers, K.; Brüning, D.; Seemann, N.; Panten, U.; Rustenbeck, I. Metabolic amplification of insulin secretion is differentially desensitized by depolarization in the absence of exogenous fuels. Metabolism: clinical and experimental 67: 1–13 (2017)

### **Tagungsbeiträge:**

Brüning, D.; Schumacher, K.; Matz, M.; Baumann, K.; Rustenbeck, I.: Granule mobility, fusion frequency and stimulated insulin secretion are differentially affected by insulinotropic stimuli. (Poster) 50. Jahrestagung der DDG, Berlin (2015).

Brüning, D.; Schumacher, K.; Matz, M.; Baumann, K.; Rustenbeck, I.: Effects of high glucose and K<sup>+</sup>-depolarization on secretion and insulin granule mobility in MIN6 cells and mouse beta cells. (Kurzvortrag) 51st EASD Annual Meeting, Stockholm, (2015).

Brüning, D.; Reckers, K.; Matz, M.; Baumann, K.; Rustenbeck, I.: Insulin granule mobility, cytosolic calcium concentration, and stimulated insulin secretion in MIN6 cells and beta cells: Differences and similarities. (Poster) 51. Jahrestagung der DDG, Berlin (2016).

Brüning, D.; Reckers, K.; Drain, P.; Rustenbeck, I.: Effects of high glucose and K<sup>+</sup>-depolarization on submembrane granule turnover in primary beta-cells as visualized by Insulin-EGFP and C-peptide-emGFP. (Kurzvortrag) 52. Jahrestagung der DDG, Hamurg (2017).

Brüning, D.; Reckers, K.; Drain, P.; Rustenbeck, I.: Glucose but not KCl diminishes submembrane granule turnover in mouse beta cells. (Kurzvortrag) 53rd EASD Annual Meeting, Lisbon, (2017).

Brüning, D.; Drain, P.; Rustenbeck, I.: Correlation of actin reorganization and granule movement in stimulated primary beta cells. (Kurzvortrag) 53. Jahrestagung der DDG, Berlin (2018).

Brüning, D.; Bütefisch, C.; Reckers, K.; Rustenbeck, I.: Glucose-induced changes of Granules and F-Actin in beta-cells as visualized by TIRF-microscopy. (Kurzvortrag) 54th EASD Annual Meeting, Berlin, (2018).

## **Danksagung**

Zu Beginn möchte ich mich herzlich bei einigen Menschen bedanken ohne die ich diese Arbeit nicht hätte schreiben können oder zumindest dabei wesentlich weniger Spaß gehabt hätte. Herr Rustenbeck danke ich dafür, dass er mir die Promotion in seinem Arbeitskreis ermöglicht hat und auch für die interessanten Themen die ich bearbeiten durfte und die motivierenden Gespräche wenn es im Labor doch mal zu frustrierenden Situationen kam. Außerdem danke ich Frau Baltrusch, dass sie sich bereit erklärt hat meine Arbeit als Referentin zu begutachten. Ich möchte mich auch bei den Mitgliedern meiner Prüfungskommission, Herr Baumann und Frau Wittstock, bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meinen Kollegen für ein angenehmes und freundliches Arbeitsumfeld bedanken, wie auch für viele witzige Abende und auch das ein oder andere Festival, auf dem wir gemeinsam waren. Ein besonderer Dank gilt dabei Kirstin Reckers, meiner Vorgängerin am TIRF-Mikroskop, und unseren technischen Assistentinnen, die mich mit viel Geduld im Labor eingearbeitet haben. Speziell möchte ich mich auch noch bei Caro bedanken, von der ich eine perfekt organisierte Zellkultur übernehmen durfte. Außerdem möchte ich mich noch bei Claudi für die Herstellung meiner DNA-Konstrukte bedanken und bei Sabine, die sehr oft Beta-Zellen für mich übrig hatte. Auch Verena möchte ich nochmal herzlich danken, dass sie mich in den Umgang mit den Mäusen eingearbeitet hat und zeitweise ihr Büro mit mir geteilt hat. Für die ganze Unterstützung in organisatorischen Fragen möchte ich mich herzlich bei unserer Sekretärin Susanne bedanken.

Eine sehr große Hilfe beim Schreiben der Arbeit waren Christoph, Angela und Anne, die geduldig meine Texte korrigiert haben. Auch wenn manchmal Sätze dabei waren, die ich selbst erst nach mehrmaligem lesen wieder verstanden habe (# Gärtners kritisches Sonntagsfrühstück ☺).

Ich danke meinen Freunden für hilfreiche und motivierende Gespräche und auch für die eine oder andere Ablenkung, wenn es mal nötig war. Das gilt natürlich auch für meine Familie und meine Partnerin Anika, denen mein größter Dank gilt. Für die tolle Unterstützung während der ganzen Zeit und das Verständnis, wenn ich mal wieder wenig Zeit hatte.

**Vielen Dank euch allen!**





# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Insulin und Diabetes-Von der Physiologie zur Pathophysiologie .....	1
1.1.1	Entstehung und physiologische Bedeutung des Insulins.....	1
1.1.2	Pathophysiologie des Diabetes Mellitus.....	2
1.2	Die Stimulus-Sekretions-Kopplung.....	7
1.2.1	Die Fuel-Hypothese.....	8
1.2.2	Die Beta-Zelle als elektrisch erregbare Zelle .....	10
1.2.3	Die Frage der Metabolischen Amplifikation.....	10
1.3	Der Weg des Insulins in der Zelle: Von der Proteinbiosynthese bis zur Exozytose .....	12
1.3.1	Bildung und Reifung der Insulin-Granula.....	12
1.3.2	Granula-Fusion und Freisetzung des Insulins .....	15
1.3.3	Experimentelle Untersuchung von Insulin-Granula.....	18
<b>2</b>	<b>Fragestellung.....</b>	<b>21</b>
2.1	Mobilität und Exozytose der submembranären Granula in Beta-Zellen .....	21
2.2	Einfluss des Aktin-Zytoskeletts auf die Mobilität und die Freisetzung der Insulin-Granula.....	21
2.3	Dynamische Bestimmung der ATP/ADP-Ratio in Beta-Zellen .....	22
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>23</b>
3.1	Verwendete Chemikalien, Reagenzien, Enzyme und Zellkulturmedien .....	23
3.2	Gewinnung primärer Zellen aus der Maus .....	27
3.2.1	Versuchstiere .....	27
3.2.2	Herstellung der Lösungen zur Isolierung und Kultivierung der Langerhans'schen Inseln und der primären Beta-Zellen.....	27
3.2.3	Isolierung und Kultivierung der Langerhans'schen Inseln .....	29
3.2.4	Isolierung und Kultivierung primärer Beta-Zellen.....	31
3.3	Zellkultur .....	33
3.3.1	MIN6-Zellen.....	33
3.3.2	AD293-Zellen.....	34
3.3.3	Steriles Arbeiten .....	34
3.3.4	Verwendete Medien und Lösungen für die Zellkultur .....	35
3.3.5	Kryokonservierung und Auftauen der Zellen.....	36
3.3.5.1	Kryokonservierung .....	36
3.3.5.2	Auftauen der Zellen .....	37
3.3.6	Bestimmung von Zellzahl und Vitalität der Zellen .....	37
3.3.7	Kultivieren und Passagieren der Zellen.....	38
3.4	Gentransfer in MIN6-Zellen und primäre Beta-Zellen.....	39
3.4.1	Verwendete Puffer und Lösungen für die molekularbiologischen Arbeiten.....	40
3.4.2	Konstruktion der Vektor-Plasmide.....	41

3.4.3	Vektor-Plasmide .....	44
3.4.4	Transiente Transfektion von MIN6-Zellen .....	54
3.4.5	Adenovirale Transduktion .....	54
3.4.5.1	Konstruktion adenoviraler Vektoren und Virenproduktion .....	55
3.4.5.2	Transduktion der primären Beta-Zellen .....	59
3.5	Fluoreszenzmikroskopische Methoden .....	60
3.5.1	Probenvorbereitung .....	61
3.5.2	Umströmung der Proben und verwendete Lösungen .....	62
3.5.3	Messung der Epi-Fluoreszenz .....	64
3.5.3.1	Cytosolische Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ .....	64
3.5.3.2	Cytosolische Messung der ATP/ADP Ratio .....	68
3.5.4	TIRF-Mikroskopische Untersuchungen .....	72
3.5.4.1	Messung der Anzahl und Dynamik von Insulingranula .....	72
3.5.4.2	Parallele Untersuchung des Aktin-Zytoskeletts und der Insulin-Granula .....	76
3.5.5	Markierung der Mitochondrien .....	77
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>78</b>
4.1	Einfluss eines maximal effektiven Glucose-Stimulus und einer maximal effektiven Kaliumdepolarisation auf perifundierte primäre Beta-Zellen .....	78
4.1.1	Messung der cytosolischen Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in einzelnen Beta-Zellen während der Stimulation mit 30 mM Glucose und 40 mM KCl .....	78
4.1.2	Fluoreszenzmarkierung der Insulin-Granula .....	83
4.1.3	Messung der Anzahl und Mobilität der Insulin-Granula mittels TIRF-Mikroskopie in einzelnen Beta-Zellen während der Stimulation mit 30 mM Glucose und 40 mM KCl .....	86
4.1.4	Messung der Insulinsekretion primärer Inseln aus NMRI-Mäusen während der Stimulation mit 30 mM Glucose und 40 mM KCl .....	94
4.2	Vergleich der Wirkung eines maximal effektiven Glucose-Stimulus mit einem physiologischen Glucose-Stimulus auf Insulin-Granula und das Aktin-Zytoskelett .....	97
4.2.1	Messung der Cytosolischen Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in einzelnen Beta-Zellen während der Stimulation mit 15 mM und 30 mM Glucose .....	97
4.2.2	Messung von Anzahl und Mobilität der Insulin-Granula mittels TIRF-Mikroskopie in einzelnen Beta-Zellen während der Stimulation mit 15 mM und 30 mM Glucose .....	99
4.2.3	Parallele Fluoreszenzmarkierung der Insulin-Granula und des Aktin-Zytoskeletts .....	101
4.2.4	Parallele Darstellung der Struktur und der Dynamik des Aktin-Zytoskeletts und der Insulin-Granula mittel TIRF-Mikroskopie in einzelnen Beta-Zellen während der Stimulation mit 15 mM und 30 mM Glucose .....	106
4.2.5	Vergleich eines Glucose-Stimulus mit dem Effekt von Latrunculin B auf die Struktur und die Dynamik von Aktin .....	110
4.3	Dynamische Bestimmung der ATP/ADP-Ratio in MIN6-Zellen und primären beta-Zellen mittels PercevalHR .....	114
4.3.1	Dynamische Bestimmung der ATP/ADP-Ratio in MIN6-Zellen .....	114

4.3.2	Dynamische Messung der ATP/ADP-Ratio in Beta-Zellen unter dem Einfluss verschiedener Stimuli .....	118
4.4	Die Lokalisation von submembranären Mitochondrien und die räumliche Beziehung zu den Insulin-Granula.....	122
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>124</b>
5.1	Methodische Vorbetrachtungen bezüglich der Markierung und der Nachverfolgung von Insulin-Granula mittels TIRF-Mikroskopie.....	124
5.1.1	Messungen der cytosolischen Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) als Qualitätskontrolle für die Intaktheit der Stimulus-Sekretionskopplung in Beta-Zellen .....	124
5.1.2	Messung der ko-Lokalisation zweier Granula-Label als qualitative Kontrolle der so markierten Granula-Populationen.....	127
5.1.3	Messung der Zahl und Dynamik der Insulin-Granula in einzelnen Beta-Zellen und Bestimmung des Einflusses eines 40 mM KCl- und eines 30 mM Glucose-Stimulus auf diese Parameter.....	129
5.1.4	Vergleich der makroskopischen Insulin-Sekretion primärer Inseln mit dem mikroskopischen Beobachtungen primärer Beta-Zellen .....	136
5.2	Vergleich und physiologische Einordnung von 15 mM Glucose und 30 mM Glucose als Stimuli für die Insulin-Sekretion.....	139
5.2.1	Einfluss verschiedener Glucose-Konzentrationen auf die $[Ca^{2+}]_i$ .....	139
5.2.2	Einfluss der Glucose-Konzentration auf Anzahl und Mobilität submembranärer Insulin-Granula.....	140
5.2.3	Parallele Markierung der Insulin-Granula und des Aktin-Zytoskeletts .....	146
5.3	Dynamische Bestimmung der ATP/ADP-Ratio in MIN6-Zellen und primären Beta-Zellen mittels PercevalHR .....	149
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>151</b>
6.1	TIRF-Mikroskopische Untersuchungen der Insulin-Granula und des Aktin-Zytoskeltetts.....	151
6.2	Untersuchung der ATP/ADP-Ratio mit PercevalHR.....	153
<b>Literaturverzeichnis .....</b>		<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>		<b>XXVIII</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>		<b>XXXII</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>		<b>XXXIV</b>
<b>Formelverzeichnis .....</b>		<b>XXXV</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Insulin und Diabetes-Von der Physiologie zur Pathophysiologie

### 1.1.1 Entstehung und physiologische Bedeutung des Insulins

Insulin ist ein Peptidhormon, das in der Bauchspeicheldrüse (Pankreas) produziert wird und den Blutzuckerspiegel reguliert. Das Pankreas ist ca. 100g schwer, besitzt eine längliche Form und ist beim Menschen im Oberbauch hinter dem Magen lokalisiert (1). Es besteht aus einem exokrinen und einem endokrinen Anteil. Im exokrinen Teil des Pankreas werden die Vorstufen von Verdauungsenzymen produziert, die in Form eines alkalischen Pankreassekrets über die Galle zum Dünndarm transportiert werden, um dort aktiviert zu werden und Nahrungsbestandteile zu verdauen. Der endokrine Teil des Pankreas besteht aus inselartigen Zellverbänden, die sich im exokrinen Gewebe des Pankreas verteilen und nach ihrem Entdecker Paul Langerhans auch Langerhans'sche Inseln genannt werden (2). Die Inseln haben einen Durchmesser von 75 – 300 µm und werden in ihrer Gesamtheit auch als Inselorgan bezeichnet, das nur ca. 1% der gesamten Organmasse ausmacht (1). Die Langerhans'schen Inseln setzen sich aus fünf Zelltypen zusammen. Den Großteil der Insel machen mit 5 – 20 % die Glukagon-produzierenden Alpha-Zellen und mit 50 – 80 % die Insulin-produzierenden Beta-Zellen aus. Die anderen Zelltypen der Langerhans'schen Inseln sind die Somatostatin-produzierenden Delta-Zellen, die PP-Zellen, die das pankreatische Polypeptid produzieren, und die Epsilon-Zellen bzw. die Ghrelin-Zellen (3,4).

Das Insulin-Molekül besteht aus 2 Peptidketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (5–7). Es wird über den Blutstrom im Körper transportiert und bindet am Insulinrezeptor der Zielzellen (8). Der Insulinrezeptor ist ein heterotetramerer Rezeptor, der aus zwei Alpha-Untereinheiten und zwei Beta-Untereinheiten besteht. Während die Alpha-Untereinheiten das Insulin extrazellulär binden, leiten die transmembranären Beta-Untereinheiten die Signale innerhalb der Zelle weiter, indem Tyrosinkinase-Domänen dieser Untereinheiten aktiviert werden (9). Das geschieht über eine Autophosphorylierung durch die Tyrosinkinasen mit anschließender Rekrutierung von Insulin-Rezeptor-Substraten (IRS), die die Signale über verschiedene Wege weiterleiten (10). Viele der molekularen Mechanismen und Signalkaskaden, die in den Zielzellen schließlich ausgelöst werden, sind bereits beschrieben (11).

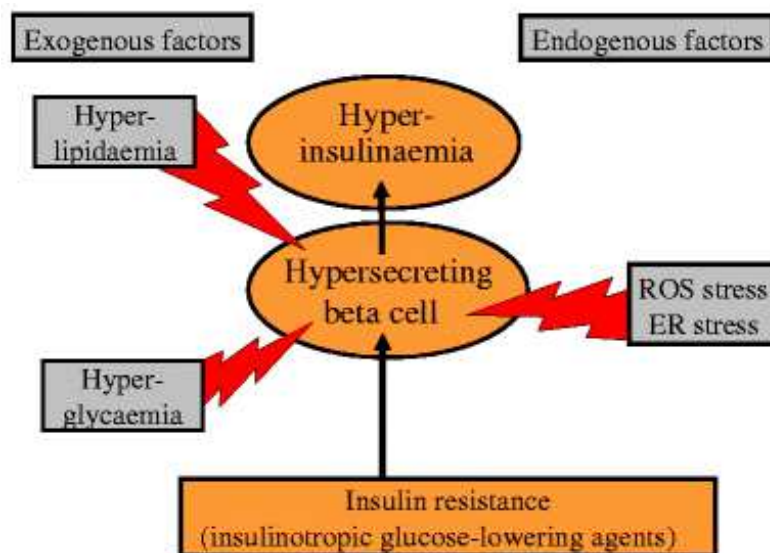
Zu den wichtigsten Zielen für die Insulinwirkung zählen die Leber, der Skelettmuskel und das weiße Fettgewebe. In den Skelettmuskelzellen und den weißen Fettzellen löst die Bindung des Insulins die Fusion von Vesikeln, in denen sich der Glucosetransporter GLUT4 befindet, mit der Plasmamembran aus. Dadurch können diese Zellen die Glucose aus dem Blut aufnehmen (12,13). Neben der Glucoseaufnahme sorgt das Insulin im Skelettmuskel für einen vermehrten Aufbau von Glykogen (14), indem es die Glykogensynthase aktiviert (15) und die Glykogenphosphorylase gleichzeitig hemmt (16). Im weißen Fettgewebe wird durch das Insulin die Lipogenese gefördert (17) und die Lipolyse gehemmt (18). Das führt zu einem Netto-Aufbau von Triglyceriden aus Fettsäuren und Glycerol, die sonst ins Blut abgegeben und von der Leber aufgenommen worden wären. Das würde zu einer verstärkten Gluconeogenese und einer verringerten Aufnahme von Glucose in die Leber führen. So sorgt die Wirkung des Insulins am Fettgewebe indirekt für eine verringerte Gluconeogenese und eine verstärkte Glykogensynthese in der Leber (18). Die Aufnahme der Glucose in der Leber verläuft anders als beim Muskel- und Fettgewebe nicht insulinabhängig über GLUT4-Transporter, sondern insulinunabhängig entlang des Konzentrationsgradienten über GLUT2-Transporter (19). Dennoch ist die Glucoseaufnahme in die Leber indirekt insulinabhängig, da neben der Glucose selbst (20) auch das Insulin die Bildung von Glykogen in der Leber verstärkt, indem es sowohl die Glykogenphosphorylase inhibiert (21) als auch die Glykogensynthase aktiviert (22) und somit die Glucosekonzentration in den Leberzellen senkt. Außerdem fördert Insulin auch in der Leber die Lipogenese (23). Schließlich fördert das Insulin auch die Proteinbiosynthese (24).

### **1.1.2 Pathophysiologie des Diabetes Mellitus**

Beim Krankheitsbild des Diabetes Mellitus ist die Kontrolle der Blutglucose gestört, was zu einer dauerhaften Erhöhung der Glucose im Blut führt. Die dabei zugrunde liegenden Stoffwechselstörungen können unterschiedlicher Natur sein (25,26). Die Klassifikation erfolgt in vier Typen. Der Typ1-Diabetes ist geprägt durch eine meist immunologisch vermittelte Beta-Zell-Zerstörung. Der Typ2-Diabetes ist als Spektrum definiert, welches das Auftreten von Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel bis zu sekretorischen Defekten mit Insulinresistenz abdeckt (s. u.). Eine weitere Form ist der Gestationsdiabetes, der erstmals während der Schwangerschaft auftritt. Die restlichen Formen des Diabetes Mellitus werden als „andere spezifische Diabetestypen“ zusammengefasst und können verschiedene Ursachen haben, wie zum Beispiel genetische Defekte der Insulinwirkung, Pankreatitis oder das Cushing-

Syndrom (26,27). Im Folgenden soll besonders auf die Entwicklung des Typ2-Diabetes näher eingegangen werden.

Es gibt momentan zwei Theorien, welche die Entwicklung eines Typ2-Diabetes erklären sollen. Die eine ist die Theorie der „Hypersekretion durch Insulinresistenz“ und die andere ist die Theorie des „sekretorischen Defekts der Beta-Zellen“. Auch wenn diese beiden Theorien unterschiedliche Ansichten beschreiben, wie ein Typ2-Diabetes entsteht, so herrscht doch in manchen Punkten bezüglich des Voranschreitens der Krankheit grundsätzlich Einigkeit. Einer davon ist, dass Glucotoxizität und Lipotoxizität die Funktionalität und Vitalität der Beta-Zellen beeinträchtigen (28,29). Außerdem ist generell akzeptiert, dass der Verlust der Beta-Zell-Masse zur Progression der Typ2-Diabetes beiträgt (30,31). Die Unterschiede beider Theorien und welche experimentellen Befunde für und gegen die jeweiligen Theorien sprechen soll nun beschrieben werden.



**Abbildung 1.1: Theorie der Hypersekretion durch periphere Insulinresistenz**

Diese Theorie geht davon aus, dass der Ursprung des Typ2-Diabetes in der Insulinresistenz der Zielzellen liegt. Um die Insulinresistenz zu kompensieren kommt es zur Hypersekretion von Insulin durch die Beta-Zellen. Die erhöhte Insulinproduktion führt zu Stress bei der Faltung der Proteine im endoplasmatischen Retikulum (ER stress) und zu oxidativem Stress (ROS stress). Diese Stressfaktoren führen schließlich zu Beta-Zell-Schäden und zur Apoptose der Beta-Zellen. Entnommen aus RUSTENBECK ET AL (32).

### Hypersekretion durch Insulinresistenz

Diese Theorie besagt, dass der Ursprung nicht in der Beta-Zelle selbst liegt, sondern in der Insulinresistenz der Zielzellen (**Abbildung 1.1**). Diese Insulinresistenz führt dann zu einer kompensatorischen Hypersekretion der Beta-Zellen. Diese erhöhte Insulinproduktion

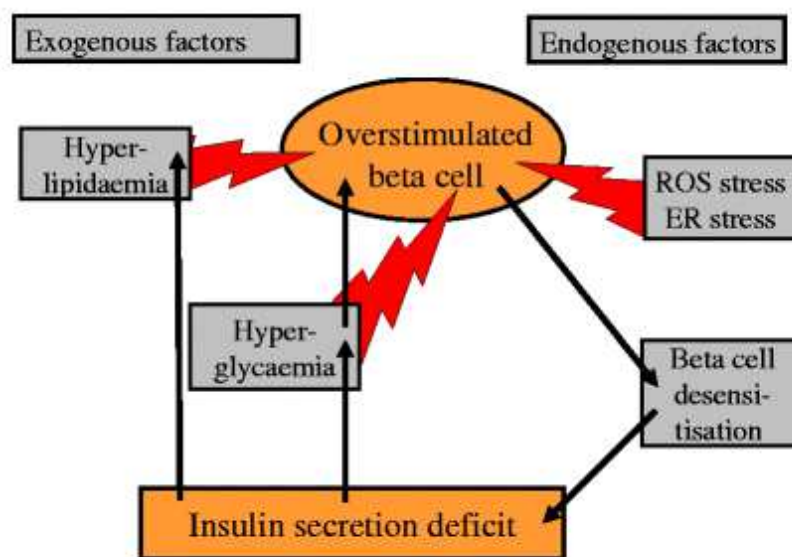
verursacht dann oxidativen Stress und ER-Stress. Schließlich führt dies zu Schäden an den Beta-Zellen und dadurch zur Abnahme der Beta-Zell-Masse durch Apoptose schon im frühen Stadium während der Entwicklung des Typ2-Diabetes (33,34). Aufbauend auf diese Theorie gibt es die Ansicht, dass Antidiabetika, welche die Insulinsekretion steigern, wie zum Beispiel Sulfonylharnstoffe, zur Progression des Typ2-Diabetes beitragen. Die gesteigerte Insulinsekretion soll in diesem Fall den oben genannten Mechanismus auslösen (Insulinproduktion → oxidativer Stress + ER-Stress → Apoptose der Beta-Zellen) (35).

Für die Theorie der Hypersekretion durch Insulinresistenz sprechen Befunde wie die progressive Verschlechterung der Blutglucose-Kontrolle mit den insulintropen Sulfonylharnstoffen, was ein Hinweis auf eine erhöhte Apoptoserate durch die gesteigerte Insulinsekretion sein kann. Diese Verschlechterung der Blutglucose-Kontrolle konnte zwar auch für andere Diabetes-Therapeutika wie Metformin und Insulin festgestellt werden, allerdings in geringerem Maße (36,37). Tatsächlich konnte auch *in vitro* gezeigt werden, dass eine verstärkte Insulinsynthese zu erhöhtem oxidativem Stress und ER-Stress führt (38,39) und dass es beim Einsatz der insulintropen Sulfonylharnstoffe zu erhöhten Apoptoseraten der Beta-Zellen kommt (40,41). Diese erhöhten Apoptoseraten sind allerdings im Mausmodell *in vivo* nicht nachweisbar (42). Geschwächt wird das Argument auch dadurch, dass die Gabe des Sulfonylharnstoffes Tolbutamid nicht zu einer erhöhten Insulinsynthese führt, die als Hauptursache für den oxidativen Stress und den ER-Stress gilt (43). Durch Tolbutamid verursachte Schäden an der Beta-Zelle korrelieren auch nicht mit dem insulintropen Effekt (44). Zudem gibt es auch insulintrope Stimuli wie das GLP-1 (45), welche die Beta-Zell-Masse eher erhalten als verringern (46). Ein weiteres Argument für die Theorie der Hypersekretion ist, dass eine verbesserte Sekretionsantwort von Beta-Zellen nach kurzzeitiger Inhibition der Sekretion mit Diazoxid beobachtet werden konnte (47). Diese kurzzeitige Blockierung der Insulinsekretion soll dabei eine Pause darstellen, in der sich die Zellen erholen können. Allerdings konnte auch die verbesserte Insulinsekretion durch kurzzeitige Inhibition der Sekretion mit Diazoxid *in vivo* an Typ2-Diabetes Patienten nicht bestätigt werden (48).



### Sekretorischer Defekt der Beta-Zellen

In dieser Theorie liegen die Gründe für die Entwicklung eines Typ2-Diabetes eher bei einem von Beginn an präsenten funktionellen, reversiblen Sekretionsdefekt der Beta-Zelle (**Abbildung 1.2**). Dieser soll zur Hyperglykämie führen, die dann eine Desensibilisierung der Beta-Zelle für Glucose verursacht. Das führt zu einer weiter verstärkten Hyperglykämie und Hyperlipidämie und schließlich zu weiteren schwereren Beta-Zell-Schäden (49,32). In dieser Theorie kommt es also erst im späteren Verlauf zu einem Verlust der Beta-Zell-Masse, wobei zu Beginn nur ein funktioneller Defekt vorliegt.



**Abbildung 1.2: Theorie des Sekretionsdefekts der Beta-Zelle**

Diese Theorie geht davon aus, dass der Ursprung des Typ2-Diabetes in einem sekretionsdefekt der Beta-Zellen liegt. Durch Sekretionsdefekt der Beta-Zellen kommt es zu einer Hyperglykämie, die dann zu einer weiteren Desensibilisierung der Beta-Zelle für Glucose-Stimuli führt. Die darauf folgende Hyperglykämie und Hyperlipidämie führen schließlich zu weiteren Beta-Zell-Schäden. Entnommen aus RUSTENBECK ET AL (32).

Ein Argument für die These des ursächlichen Beta-Zell-Defekts ist, dass genetische Risikofaktoren für die Ausbildung eines Typ2-Diabetes eher in Genen liegen, die für die Funktion der Beta-Zelle verantwortlich sind und nicht in solchen, die die Insulinwirkung steuern (50). Ein weiterer Hinweis ist, dass erstgrade Verwandte von Typ2-Diabetikern auch Sekretionsdefekte haben, auch wenn sie keinen Typ2-Diabetes ausbilden. Dies zeigt, dass das Sekretionsdefizit einen unabhängigen Risikofaktor darstellt (51).

Ein zentraler Punkt ist die Frage, ob es in den frühen Stadien des Typ2-Diabetes eher zu einem Verlust der Beta-Zell-Masse kommt, was eher für die Theorie der Hypersekretion durch Insulinresistenz spräche, oder eher zu einem Funktionsverlust der Beta-Zellen, was für die Theorie des Beta-Zell-Defekts spräche.

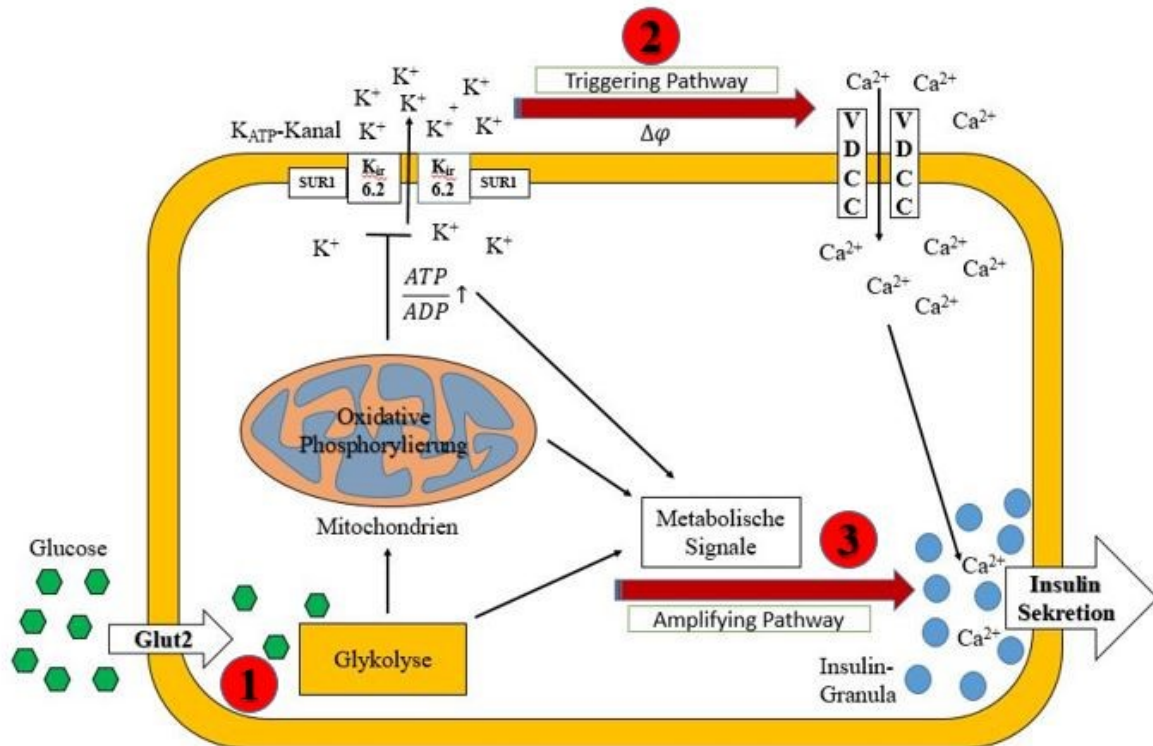
#### Verlust der Beta-Zell-Funktion vs Verlust der Beta-Zell-Masse

Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl und die Funktion der Beta-Zellen von Typ2-Diabetikern im Vergleich zu Nicht-Diabetikern verringert sind und diese Verringerung mit der Dauer des Typ2-Diabetes korreliert. Dabei reicht der eher geringe Verlust der Beta-Zell-Masse in frühen Stadien als alleinige Erklärung für die Entwicklung des Typ2-Diabetes allerdings nicht aus (31). Neuere Untersuchungen zeigen, dass zumindest in Teilen der Typ2-Diabetes-Patienten der Funktionsverlust der Beta-Zellen einen größeren Einfluss hat als der Verlust der Beta-Zell-Masse (52). Einige Untersuchungen legen nahe, dass es sich dabei hauptsächlich um eine Entdifferenzierung der Beta-Zellen handelt (53,54). Bei der Untersuchung der Pankreata von Typ2-Diabetikern im Vergleich mit Pankreata von Nicht-Diabetikern konnte festgestellt werden, dass es nur geringe Unterschiede in der Beta-Zell-Masse gab, die Beta-Zellen der Typ2-Diabetiker allerdings deutlich weniger Granula hatten als die der Nicht-Diabetiker. Das spricht eher für eine funktionelle Veränderung der Beta-Zellen, die nicht notwendigerweise mit einer Entdifferenzierung begründet sein muss (55).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Ausbildung eines Typ2-Diabetes nicht monokausal erklärt werden kann. Wie die oben genannte aktuelle Definition nahelegt, tragen beide genannten Modelle, neben weiteren Einflussfaktoren, in wechselnden Anteilen zur Entwicklung des Typ2-Diabetes bei (56). Ein allgemein gültiger Mechanismus, der alle Aspekte der Pathogenese des Typ2-Diabetes erklärt, ist zumindest noch nicht bekannt.

## 1.2 Die Stimulus-Sekretions-Kopplung

Generell verläuft die Stimulus-Sekretions-Kopplung über die Aufnahme von Glucose über GLUT-Transporter in die Beta-Zelle. Bei Mäusen und Ratten sind die GLUT2-Transporter für die Aufnahme der Glucose verantwortlich, während diese Aufgabe in menschlichen Beta-Zellen von GLUT1- und GLUT3-Transportern übernommen wird (57,58). Die Schwellenkonzentration der Glucose, die nötig ist um eine Insulinsekretion zu stimulieren, unterscheidet sich zwischen 3 mM beim Menschen (59) und 6 mM Mäusen (60). Die aufgenommene Glucose wird von der Beta-Zelle metabolisiert um ATP zu produzieren (**Abbildung 1.3, Punkt 1**). Die ATP-Produktion erhöht die ATP/ADP-Ratio im Cytosol, was zum Schließen ATP-abhängiger Kaliumkanäle führt. Der verminderte Kaliumefflux führt daraufhin zur Depolarisation der Plasmamembran, wodurch spannungsabhängige L-Typ Calciumkanäle geöffnet werden (**Abbildung 1.3, Punkt 2**). Durch den Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration werden die Insulin-Granula schließlich freigesetzt. Dieser Verlauf wird *Triggering Pathway* genannt, da er notwendig ist um eine Insulinsekretion auszulösen. Es existiert noch ein zweiter Weg, der *Amplifying Pathway* genannt wird, da er selbst keine Sekretion auslösen, allerdings eine bereits ausgelöste Sekretion von Insulin-Granula verstärken kann. Diese Amplifizierung wird vermutlich durch einen oder mehrere Stoffe ausgelöst, die bei der Metabolisierung der Glucose aus dem Citrat-Zyklus exportiert werden, ein Vorgang, der als Kataplerose bezeichnet wird (**Abbildung 1.3, Punkt 3**). Im Folgenden sollen die in Abbildung 3 hervorgehobenen Punkte, der Einfluss der Glucose auf die Insulinsekretion, die elektrische Aktivität der Beta-Zelle in der Stimulus-Sekretions-Kopplung und die metabolische Amplifikation noch einmal genauer betrachtet werden.



**Abbildung 1.3: Schematisches Modell der Stimulus-Sekretions-Kopplung in Beta-Zellen**

Glucose wird über den GLUT2-Transporter in die Beta-Zelle aufgenommen (beim Menschen GLUT1) und über Glykolyse und oxidative Phosphorylierung verstoffwechselt. Durch die Verstoffwechslung der Glucose steigt die ATP/ADP-Ratio in der Zelle, wodurch ATP-abhängige K<sup>+</sup>-Kanäle (K<sub>ATP</sub>-Kanäle) geschlossen werden. Das führt zur Depolarisation der Plasmamembran und dadurch zur Öffnung spannungsabhängiger Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (VDCC). Der Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) ist schließlich das Signal für die Insulinsekretion (Triggering Pathway). Die Sekretion kann außerdem durch weitere metabolische Signale aus dem Glucose-Stoffwechsel verstärkt werden (Amplifying Pathway). Die Punkte 1 - 3 werden in den folgenden Kapiteln genauer behandelt: (1) Wie erkennt die Beta-Zelle steigende Glucose-Konzentrationen und den dadurch steigenden Insulinbedarf? (**Kapitel 1.2.1: Die Fuel-Hypothese**); (2) Wie Übersetzt die Beta-Zelle ein metabolisches Signal in ein elektrisches Signal? (**Kapitel 1.2.2: Die Beta-Zelle als elektrisch erregbare Zelle**); (3) Wie vermittelt die Beta-Zelle die metabolische Amplifikation (**Kapitel 1.2.3: Die Frage der metabolischen Amplifikation**).

### 1.2.1 Die Fuel-Hypothese

Um die Wirkung der Glucose an der Beta-Zelle zu erklären, konkurrierten zunächst zwei Theorien. Eine war die Rezeptor-Hypothese, die besagt, dass die Glucose die Insulinsekretion auslöst, indem sie an einen stereospezifischen Glucose-Rezeptor an der äußeren Membran der Beta-Zelle bindet (61). Demgegenüber steht die „substrate site“- oder „fuel“-Hypothese, die besagt, dass die Metabolisierung der Glucose notwendig ist, um die Signale für die Insulinsekretion zu bilden (62).

Tatsächlich konnte in aktuellen Untersuchungen sowohl in MIN6-Zellen als auch in primären Inseln von Mäusen der membranständige T1R3 Rezeptor als möglicher Kandidat für einen Glucose-Rezeptor nachgewiesen werden (63). Der T1R3-Rezeptor ist auf der Zunge, hauptsächlich als heterodimer mit T1R2, in der Lage süßen Geschmack wahrzunehmen (64). In der Beta-Zelle interagiert der T1R3 Rezeptor sowohl mit Glucose und Fruktose als auch mit verschiedenen Süßstoffen und nicht-metabolisierbaren Glucose-Analoga. Die Wirkung der einzelnen Liganden ist dabei verschieden, aber generell kann der Rezeptor die Erhöhung der intrazellulären ATP-Konzentration, der cytosolischen Calciumkonzentration und des intrazellulären cAMP vermitteln und so die Insulinfreisetzung fördern (65–67).

Dennoch ist die Fuel-Hypothese heute allgemein als grundlegend wichtig anerkannt. Viele Hinweise sprechen klar dafür, dass die insulinotrope Wirkung von Glucose und anderen Stoffwechselstimuli, die die Insulinsekretion steigern, mit deren Metabolisierbarkeit zusammenhängt (68–72). Es konnte auch gezeigt werden, dass durch eine provozierte Glycogenolyse und Glycolyse aus endogenen Speichern auch die Sekretion von Insulin ausgelöst werden kann (73). Außerdem konnte gezeigt werden, dass eigentlich von der Beta-Zelle nicht-metabolisierbare und somit nicht-insulinotrope Stoffe wie Glycerol eine Insulinsekretion auslösen konnten, wenn das Protein Glycerolkinase von den Beta-Zellen exprimiert wurde, wodurch das Glycerol metabolisiert werden konnte (74). Mit der Entdeckung des ATP-abhängigen Kaliumkanals wurde auch das Bindeglied zwischen Metabolismus und den elektrischen Ereignissen beschrieben, die die stimulierte Insulinsekretion begleiten (75).

Die Metabolisierung der Glucose wird nach der Aufnahme in die Beta-Zelle durch die Glucokinase eingeleitet, welche die Glucose phosphoryliert. Die Glucokinase wurde daher auch als Glucose-Sensor der Beta-Zelle bezeichnet und wurde als der alleinige geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Beta-Zell-Metabolismus und der Insulinsekretion vorgeschlagen (76). Andere Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, dass die Insulinsekretion hauptsächlich durch den nachfolgenden mitochondrialen Metabolismus kontrolliert wird (74). Das bedeutet, dass auch der mitochondriale Metabolismus zumindest für die Insulinsekretion geschwindigkeitsbestimmend ist. Dazu passend konnte gezeigt werden, dass die Entkopplung der ATP-Produktion vom Glucose-Metabolismus in den Mitochondrien durch das endogene Entkoppler-Protein UCP2 die Insulinproduktion senkt (77). Umgekehrt führt das Entfernen des endogenen Entkopplers zu einer Verstärkung der Glucose-induzierten Insulinsekretion (78).

### 1.2.2 Die Beta-Zelle als elektrisch erregbare Zelle

Im Jahr 1968 konnte von Dean und Matthews gezeigt werden, dass Beta-Zellen elektrisch erregbare Zellen sind (79). Das Ruhemembranpotential der Beta-Zellen wird durch die Aktivität der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase und die im Ruhezustand offenen ATP-abhängigen Kaliumkanäle ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle) aufgebaut und beträgt ca. -70 mV (80). Die elektrische Aktivität der Beta-Zellen kann mit der Patch-Clamp-Methode untersucht werden (81). Mit dieser Methode konnte zunächst an einzelnen Beta-Zellen gezeigt werden, dass hohe extrazelluläre Glukosekonzentrationen beziehungsweise hohe intrazelluläre ATP-Konzentrationen den  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal schließen und dadurch den Ausstrom von  $\text{K}^+$ -Ionen verringern (82).

Dadurch kommt es zu einer Depolarisation der Membran und somit zur Öffnung spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, also zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle (83,84). Die anschließende Repolarisation erfolgt dann hauptsächlich durch die Öffnung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger  $\text{K}^+$ -Kanäle (85) und spannungsabhängiger  $\text{K}^+$ -Kanäle (83,84). Patch-Clamp-Untersuchungen an einzelnen Beta-Zellen innerhalb einer Insel konnten zeigen, dass die Beta-Zellen innerhalb der Insel über *gap junctions* elektrisch gekoppelt sind. Diese Kopplung ist nur zwischen Beta-Zellen untereinander, aber nicht zwischen Beta-Zellen und anderen Zelltypen zu sehen. Außerdem zeigen die Beta-Zellen innerhalb der Insel eine oszillierende elektrische Aktivität, die in einzelnen Beta-Zellen nicht zu finden ist (86).

Es wurden einige Wirkstoffe beschrieben, die mit den Ionenkanälen der Beta-Zelle interagieren. So führen Sulfonylharnstoffe zum Schließen der  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle und damit zu einer Steigerung der Insulinsekretion (87), wohingegen das Diazoxid die  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle offen hält und die Insulinsekretion hemmt (88). Auch  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Blocker wie Verapamil und Nifedipin können die Insulinsekretion praktisch vollständig unterdrücken (89).

### 1.2.3 Die Frage der Metabolischen Amplifikation

Das Konzept der metabolischen Amplifikation wurde etabliert, nachdem Glucose in zwei unterschiedlichen Experimenten, in denen die Plasmamembran der Beta-Zelle bereits stark depolarisiert war, zu einer dosisabhängigen Steigerung der Insulinsekretion führte (90). In einem experimentellen Aufbau waren die  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle mit Diazoxid permanent geöffnet, während die Plasmamembran mit 30 mM KCl depolarisiert wurde (91,92). Im anderen experimentellen Aufbau wurden alle  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle mit einer maximal effektiven Konzentration von Sulfonylharnstoffen geschlossen um die Depolarisation der Plasmamembran auszulösen

(93–95). Der genaue Mechanismus der metabolischen Amplifikation ist bisher nicht bekannt. Es gibt aber einige Kandidaten, die möglicherweise als Signalmoleküle für die Vermittlung der metabolischen Amplifikation in Frage kämen. Darunter sind ATP, GTP, langkettige Acyl-CoAs und einige metabolische Zwischenprodukte aus dem mitochondrialen Stoffwechsel, die ins Cytosol exportiert werden können (96–98). Ergebnisse von PANTEN ET AL. legen nahe, dass die metabolische Amplifizierung durch den Export von Metaboliten aus den Mitochondrien vermittelt wird, nicht aber durch die mitochondriale Energieproduktion. In dieser Arbeit wurden Citrat und Acetoacetat als Vermittler der metabolischen Amplifikation vorgeschlagen (99). Beide Stoffe sind Quellen für die Produktion von cytosolischem Acetyl-CoA, welches dann für die Acetylierung regulatorischer Proteine, wie zum Beispiel RhoGDI, bereitstehen soll (100).

Es konnte früh gezeigt werden, dass Glucose-Konzentrationen, die für eine Depolarisation der Plasmamembran noch nicht ausreichen, bereits amplifizierende Signale produzieren. Diese amplifizierenden Signale schlagen sich allerdings ohne vorheriges *Triggering*-Signal nicht in einer erhöhten Sekretion nieder (101). Das bedeutet, dass es eine klare Hierarchie zwischen dem *Triggering Pathway* und dem *Amplifying Pathway* (Amplifizierung) gibt (102). Diese Hierarchie ist bereits in der Terminologie der beiden Begriffe Trigger (Auslöser) und Amplifier (Verstärker) festgelegt (90). Alternativ werden diese beiden Signalwege auch als „K<sub>ATP</sub>-Kanal abhängiger Weg“ und „K<sub>ATP</sub>-Kanal unabhängiger Weg“ bezeichnet. Bei dieser Benennung werden allerdings vorhandene Parallelen zwischen Glucose-induzierter Sekretion und der Rezeptor-vermittelten Sekretionsverstärkung durch Neurotransmitter wie Acetylcholin oder Inkretine wie das GLP-1 nicht deutlich. Wie die Glucose produzieren sowohl Acetylcholin als auch GLP-1 sowohl amplifizierende Signale (103–105) als auch *Triggering* Signale (103,106). In der Terminologie der K<sub>ATP</sub>-Abhängigkeit wären aber alle Arten der Rezeptor-vermittelten Sekretionsverstärkungen immer einfach K<sub>ATP</sub>-unabhängig und die Unterscheidung zwischen den verschiedenen Wegen der Sekretionsverstärkung entfielen (102). Das lässt sich am Beispiel des GLP-1 erklären. Zum einen erhöht das GLP-1 die cytosolische Ca<sup>2+</sup>-Konzentration durch die Mobilisierung von Ca<sup>2+</sup> aus internen Speichern, was einem K<sub>ATP</sub>-unabhängigen *Triggering* Signal entspricht (106). Zum anderen verstärkt GLP-1 die Produktion von cAMP, das über verschiedene Signalwegen amplifizierende Signale auslöst, die ebenfalls K<sub>ATP</sub>-unabhängig sind (104,105).

### 1.3 Der Weg des Insulins in der Zelle: Von der Proteinbiosynthese bis zur Exozytose

Das Insulingen befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 (107). Nach der Transkription des Gens verlässt die mRNA den Zellkern und wird von den Ribosomen am rauen endoplasmatischen Retikulum (RER) translatiert. Dabei entsteht das Präproinsulin, das neben der A-Kette, der B-Kette und dem C-Peptid noch eine amino-terminale Signalsequenz trägt. Durch die Signalsequenz wird das Präproinsulin direkt in das Lumen des RER aufgenommen. Dort wird die Signalsequenz abgespalten, wodurch das Proinsulin entsteht (108).

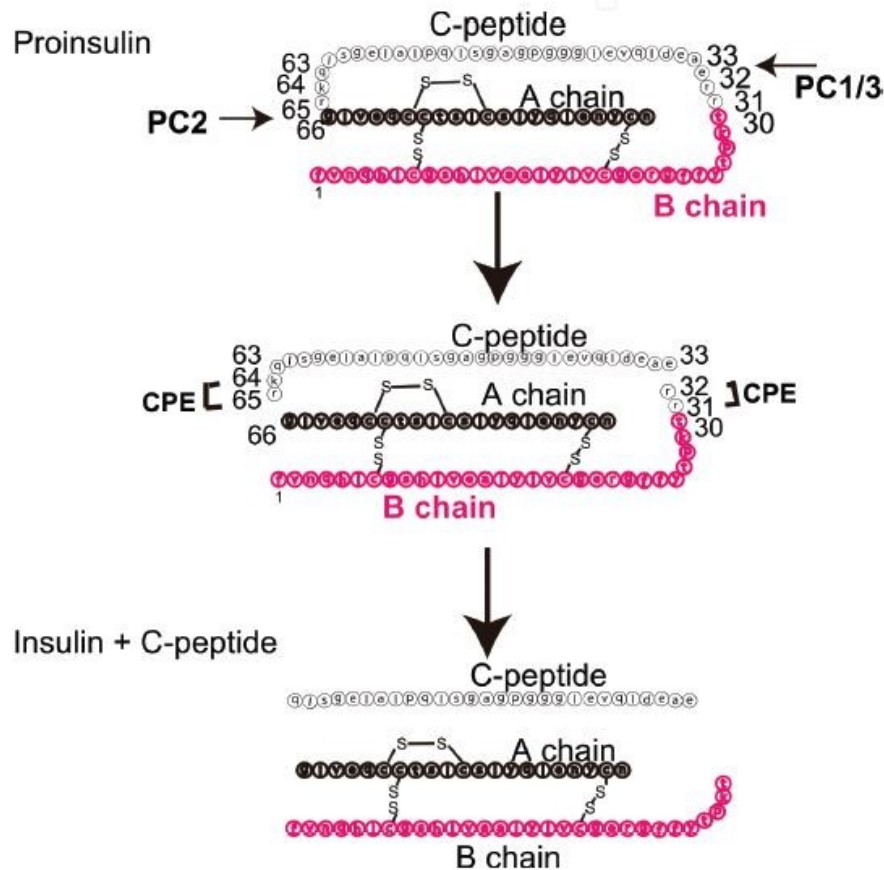
#### 1.3.1 Bildung und Reifung der Insulin-Granula

Das Proinsulin wird dann in das trans-Golgi-Netzwerk (TGN) transportiert. Dort findet der Hauptteil der Sortierung von Proteinen statt (109), die danach zur Plasmamembran transportiert werden, um entweder sezerniert oder in die Plasmamembran integriert zu werden. Die Sortierung im TGN wird als *sorting for entry* bezeichnet, weil dabei die Entscheidung fällt, ob ein Stoff in Granula verpackt wird, die ihren Inhalt durch eine stimulierte Exozytose sezernieren, oder in Vesikel, die konstitutiv mit der Plasmamembran fusionieren um ihren Inhalt freizusetzen (110,111). Bei dieser Sortierung wird das Insulin zu über 99 % in Granula sortiert, die reguliert durch einen Stimulus (z. B. Glucose) freigesetzt werden (112). Wie die Sortierung des Proinsulins genau abläuft, ist allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wurde die Existenz eines Sortierungs-Rezeptors für Insulin vorgeschlagen. Ein solcher Rezeptor ist allerdings bisher nicht gefunden worden (113). Eine weitere Vermutung ist die Sortierung des Insulin durch Oligomerisierung, da Proinsulin mit  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$  Hexamere bildet. Diese Hexamere können an Cholesterol binden, welches in hochorganisierten Membrandomänen, die als Lipid-Rafts bezeichnet werden, angereichert ist. Dadurch können viele Proinsulin-Hexamere an einem Ort immobilisiert werden (114). Aber auch die Sortierung durch Oligomerisierung ist umstritten. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass es im Insulinmolekül eine Art Sortierungsdomäne gibt. Durch Mutationen in den Aminosäuren 16 + 17 der A-Kette und 13 + 17 der B-Kette des Insulins wurde das Insulin hauptsächlich über den konstitutiven Weg und damit stimulationsunabhängig ausgeschüttet (115).

Nach der Sortierung im TGN entstehen erst einmal unreife Insulin-Granula. Diese unreifen Granula sind noch von einer Clathrin-Hülle umgeben und beinhalten hauptsächlich Proinsulin (116), welches in Form von Hexameren zusammen mit  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$  als



$[(\text{Zn}^{2+})_2(\text{Ca}^{2+})(\text{Proinsulin})_6]$  vorliegt (112,117). Ein wichtiger Schritt für die Reifung der Insulin-Granula ist die Azidifizierung des Granula-Lumens durch ATP-abhängige Protonenpumpen (110,118,119). Die Azidifizierung verstärkt die Umwandlung von Proinsulin zu Insulin, da die dafür verantwortlichen Endopeptidasen PC1/3 und PC2 (Prohormon Convertase 1/3 und Prohormon Convertase 2) ein pH-Optimum haben, welches mit 5,5 im sauren Bereich liegt. Die Endopeptidasen spalten während der Reifung des Granulums das C-Peptid vom Proinsulin ab (120). Eine dritte Peptidase, das CPE, spaltet danach die beiden carboxy-terminalen Aminosäuren der B-Kette ab, wodurch das Insulin entsteht (**Abbildung 1.4**) (113). Durch die Umwandlung von Proinsulin zu Insulin sinkt die Löslichkeit der so entstandenen  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Zn}^{2+}$ -abhängigen Insulin-Hexamere, wobei sich die stöchiometrische Zusammensetzung nicht verändert  $[(\text{Zn}^{2+})_2(\text{Ca}^{2+})(\text{Insulin})_6]$  (117). Durch die verringerte Löslichkeit kondensieren die Hexamere dann zu einem Kristall, der in elektronenmikroskopischen Untersuchungen als dichter Kern der Insulin-Granula beschrieben wurde, weshalb die Insulin-Granula auch als *dense core granules* bezeichnet werden (121). Es konnte früh gezeigt werden, dass  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  wichtige Faktoren sind, damit während der Reifung des Granulums ein kondensierter kristalliner Kern aus Insulin entstehen kann (122). Dafür ist unter anderem die Anreicherung von  $\text{Zn}^{2+}$  im Granulum nötig. Die Anreicherung wird über spezielle Zink-Transporter in der Granulum-Membran erreicht, die als ZnT8 (Zink Transporter 8) bezeichnet werden und ausschließlich in der Membran der Insulin-Granula lokalisiert sind (123,124). Es konnte bereits gezeigt werden, dass ZnT8 eine wichtige Rolle in der Insulinsekretion spielt und das Gen ein Suszeptibilitätsgen für Typ2 Diabetes ist (123,125). Ein weiterer Schritt in der Reifung der Insulin-Granula ist, dass die Assoziation der Granula mit dem Protein Clathrin verringert wird. Das Clathrin befindet sich bei unreifen Granula an der äußeren Granulum-Membran (110,119,126). Bei der Entfernung des Clathrins können kleine Teile der Granula wieder abgeschnürt werden um unerwünschte, lösliche Bestandteile wieder aus dem Granulum zu entfernen (127). Dieser Prozess wird entweder, aus der Sicht der entfernten Substanzen, als *sorting for exit* (111) oder, aus der Sicht des kristallinen Insulinkerns, als *sorting by retention* (113) bezeichnet. Beides bezeichnet aber den gleichen Prozess.



**Abbildung 1.4: Prozessierung des Proinsulins während der Reifung der Insulin-Granula**

Das Proinsulin wird von den beiden Endopeptidasen PC1/3 (Prohormon Convertase 1/3) und PC2 (Prohormon Convertase 2) geschnitten, wodurch das C-Peptid abgespalten wird. Anschließend werden die beiden carboxy-terminalen Aminosäuren der B-Kette von der Peptidase CPE entfernt, wodurch das Insulin entsteht. Entnommen aus SAITO ET AL (113).

Der Transport der Granula vom TGN zur Peripherie der Zelle erfolgt zunächst über die Mikrotubuli. Die Granula können auf den Mikrotubuli in beide Richtungen transportiert werden, durch das Motorprotein Kinesin zur Plasmamembran und durch Dynein von der Plasmamembran weg ins Zellinnere. Wenn sich die Mikrotubuli kreuzen, kann sich an dem Punkt die Bewegungsrichtung des Granulums ändern, indem ein anderes Motorprotein den Transport übernimmt. Das bedeutet, je dichter das Mikrotubuli-Netzwerk ist, desto schwieriger ist ein gerichteter Transport zur Plasmamembran. Ein Glucose-Stimulus kann die Dichte der Mikrotubuli verringern und den Transport zur Plasmamembran verbessern (128). An der Peripherie der Zelle kann dann das Aktin den Transport der Granula übernehmen. Granula können durch die Motorproteine Myosin II und Myosin Va an das Aktin binden. Das Aktin erfüllt dabei eine doppelte Rolle: Ohne Stimulation mit Glucose ist das Aktin dicht verzweigt und erfüllt eine Barriere-Funktion gegen die unkontrollierte Exozytose. Nach der Stimulation

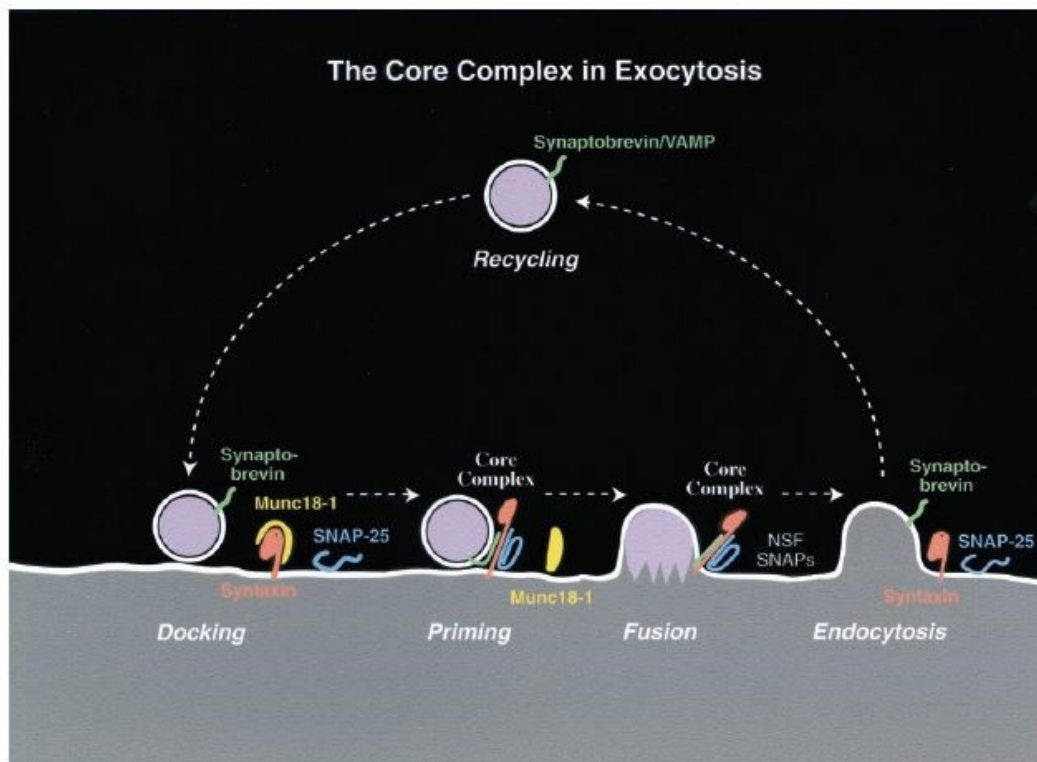
mit Glucose kommt es in Beta-Zellen zum Glucose-abhängigen Umbau des Aktins. Das submembranäre Aktin-Netzwerk ist danach weniger dicht und spielt sogar eine aktive Rolle, die Granula zur Plasmamembran transportieren (129).

### 1.3.2 Granula-Fusion und Freisetzung des Insulins

Bei der stimulierten Exozytose kann zwischen zwei Arten von Vesikeln unterschieden werden (130). Zum einen gibt es große Vesikel mit einem „dichten Kern“, die Peptidhormone wie das Insulin enthalten, sie werden auch Granula genannt. Diese Vesikel entstehen im TGN und werden dort direkt mit den Peptidhormonen beladen. Die Sekretion dieser Vesikel verläuft relativ langsam (131). Die anderen Vesikel sind kleine synaptische Vesikel, die Neurotransmitter enthalten, welche direkt im Cytosol über Transporter aufgenommen werden (132). Diese Vesikel benötigen nicht das TGN, um ihre Ladung aufzunehmen (133) und werden sehr schnell sezerniert (134). Trotz der genannten Unterschiede haben die beiden Vesikel-Arten auch Gemeinsamkeiten. Vor der Sekretion müssen sowohl die großen Vesikel mit dichtem Kern als auch die kleinen synaptischen Vesikel zwei wichtige Schritte durchlaufen. Der eine ist das *Docking*, bei dem die Vesikel an die Plasmamembran angeheftet werden und der andere ist das *Priming*, in dem die angehefteten Vesikel für die Fusion bereit gemacht werden (135).

Die zentralen Komponenten aller Exozytosevorgänge sind die SNARE-Proteine (soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor). Diese werden nach ihrer Lokalisation in der Zelle in t-SNAREs und v-SNAREs eingeteilt, wobei das t für target, also die Plasmamembran, und das v für Vesikel steht. Alternativ werden sie auch in Q-SNAREs und R-SNAREs eingeteilt. Diese Einteilung bezieht sich auf die Aminosäuren Glutamin (Q) und Arginin (R), die sich im Zentrum des SNARE-Motivs befinden (136). Bei diesen Definitionen entsprechen die t-SNAREs den Q-SNAREs und die v-SNAREs den R-SNAREs (130). Bei einer Exozytose interagieren jeweils zwei Klassen von t-SNAREs, ein Syntaxin und das SNAP-25 (synaptosomal-associated protein of 25 kDa), mit einem v-SNARE aus der Klasse der VAMP (vesicle-associated membrane proteine) (137). Syntaxine sind carboxy-terminal mit der Plasmamembran verankert, dann folgt ein SNARE-Motiv und amino-terminal eine Habc-Domäne, die aus drei  $\alpha$ -Helices aufgebaut ist (138). SNAP-25 besteht aus zwei SNARE-Motiven, die über eine lange Linker-Sequenz verbunden sind. Es besitzt keine Transmembrandomäne, ist aber über Palmitoyl-Gruppen, die an Cysteine in der Linker-Sequenz gebunden sind, an die Membran angelagert (139). Schließlich bestehen Proteine aus

der Klasse der VAMP aus einer carboxy-terminalen Transmembrandomäne und einem SNARE-Motiv (140).



**Abbildung 1.5: Modell der Granula-Exozytose**

Zunächst liegt Syntaxin in seiner geschlossenen Konformation vor und ist an Munc 18a (Munc 18-1) gebunden. Wenn dieser Komplex aufgelöst wird kann das Syntaxin mit SNAP-25 und dem im Granulum lokalisierten VAMP (Synaptobrevin) interagieren. Durch die Interaktion der drei Proteine miteinander wird der Kern-Komplex gebildet der aus insgesamt vier Snare-Motiven besteht. Diese Snare-Motive sind  $\alpha$ -helicale Proteinstrukturen, die sich im Kern-Komplex zu einer so genannten coiled coil Struktur zusammenlagern. Nach der Fusion des Granulums wird der Kern-Komplex von dem Protein NSF (N-ethylmaleinimide-sensitive factor) in einem ATP-abhängigen Prozess wieder getrennt. Entnommen aus GERBER ET AL (130).

Die Exozytose selbst kann als ein Kreislauf von Prozessen dargestellt werden (**Abbildung 1.5**). Zuerst liegt Syntaxin in seiner geschlossenen Konformation vor, bei der das Habc-Motiv auf das SNARE-Motiv gefaltet ist und nicht mit SNAP-25 interagieren kann (141). In dieser Konformation ist das Syntaxin an ein regulatorisches Protein, das Munc 18a (oder auch Munc 18-1) gebunden (142). Munc 18a ist essenziell für die Granula-Fusion (143). Man vermutet, dass Munc 18a das Docking des Granulums an die Plasmamembran vermittelt (144). Wird der Komplex zwischen Syntaxin und Munc 18a aufgelöst, kann das Syntaxin mit dem SNAP-25 und dem VAMP interagieren. Diese bilden mit ihren insgesamt vier  $\alpha$ -helicalen SNARE-Motiven dann eine sogenannte coiled-coil Struktur, die auch als Kern-Komplex bezeichnet wird (145). In diesem Komplex sind die hydrophoben Bereiche in der coiled-coil Struktur verborgen

und es bilden sich Salz-Brücken zwischen den Glutaminen (Q) und Argininen (R) der SNARE-Motive aus. Das macht den Kern-Komplex extrem stabil und liefert möglicherweise die nötige Energie für die Membranfusion bei der Exozytose (146). Schließlich trennt das Protein NSF (*N*-ethylmaleimide-sensitive factor) den Kernkomplex nach der Fusion in einem ATP-abhängigen Prozess wieder und das Syntaxin bindet erneut an Munc 18a (147).

Bei dem Prozess der stimulierten Exozytose gibt es an einer Stelle eine Art Stopp-Signal, welches den Fusions-Prozess unterbindet. Die Exozytose kann erst dann stattfinden, wenn ein geeigneter Stimulus anwesend ist. Ein möglicher Kandidat für die Vermittlung des Stopp-Signals ist das Complexin. Das Complexin bindet am Kern-Komplex, während dieser sich aus den vier beteiligten  $\alpha$ -helicalen SNARE-Motiven ausbildet. So kommt es zwar zur Interaktion der SNARE-Motive, allerdings ist diese Interaktion unvollständig, da sie vom Complexin gestört wird. Das verhindert die vollständige Ausbildung des Kern-Komplexes, solange das Complexin anwesend ist. Das entsprechende Signal, um dieses Stopp-Signal zu überwinden, wäre eine Erhöhung der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Das entspricht dem *Triggering Pathway* in der Insulinsekretion (siehe: **Kapitel 1.2.3**). Durch die Erhöhung der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird das Complexin durch Synaptotagmine vom Kern-Komplex verdrängt (148). Synaptotagmine sind  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensoren, die aus einer amino-terminalen Transmembrandomäne, einem zentralen Linker und zwei carboxy-terminalen  $\text{C}_2$ -Domänen bestehen (130). Die  $\text{C}_2$ -Domänen sind in der Lage,  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig Phospholipide und Syntaxin zu binden (149). Synaptotagmin1 ist für die schnelle  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Exozytose notwendig (150). Die Synaptotagmine können sowohl am Vesikel lokalisiert sein, wie Synaptotagmin1 und Synaptotagmin2 (151), als auch an der Plasmamembran, wie Synaptotagmin7 (152).

Bereits früh wurde beschrieben, dass an der Exozytose der Insulin-Granula in den Beta-Zellen die SNARE-Proteine Syntaxin1 (153), SNAP-25 (154) und VAMP2 (155) beteiligt sind. Die relevanten  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensoren für die Fusion der Insulin-Granula sind vermutlich Synaptotagmin1 und Synaptotagmin7 (156). Neuere Untersuchungen legen nahe, dass es eine weitere Art der Granula-Fusion in Beta-Zellen gibt, an der andere Komponenten beteiligt sind. Das soll für die Fusion der neu an der Plasmamembran ankommenden Granula gelten, die sehr schnell nach ihrer Ankunft mit der Plasmamembran fusionieren, aber auch für Fusionen zwischen zwei Insulin-Granula (157). Als v-SNARE ist bei dieser Art der Fusion das VAMP8 beteiligt, das auch ausschlaggebend dafür sein soll, dass diese Art der Fusion stattfindet (158). Neben dem SNAP-25 ist außerdem das Syntaxin3 als drittes SNARE-Protein beteiligt (159). Die Bildung dieses SNARE-Komplexes soll in Abhängigkeit von Munc 18b erfolgen (160).

### 1.3.3 Experimentelle Untersuchung von Insulin-Granula

Die klassische Untersuchung der Insulin-Sekretion ist die Umströmung von isolierten pankreatischen Inseln. Bei diesen Experimenten wird ein Rechteckstimulus verwendet, d.h. ein Stimulus, wie zu Beispiel 30 mM Glucose, flutet sehr schnell an und wird auch schnell wieder ausgewaschen. Unter diesen experimentellen Bedingungen entsteht ein biphasisches Insulin-Sekretionsmuster (161). Die biphasische Sekretion führte schon früh zu der Vermutung, dass Insulin-Granula in der Beta-Zelle in zwei unterschiedliche Kompartimente gespeichert sein müssten (162).

Durch Elektronen-mikroskopische Untersuchungen war es später möglich, die Granula innerhalb der Beta-Zellen zu untersuchen. Dabei fiel auf, dass es Granula gibt, die direkt an die Plasmamembran angedockt sind (docked granules) und welche, die ein paar hundert Nanometer von der Plasmamembran entfernt sind. In Zusammenhang mit Kapazitätsmessungen, durch die einzelne Granula-Fusionen messbar waren, führten diese Beobachtungen zu der Formulierung der Pool-Hypothese durch RORSMANN und RENSTROM. Die Pool-Hypothese besagt, dass es zwei unterschiedliche Pools von Granula gibt. Der eine ist der „readily releasable pool“ (RRP), zu dem die Granula gehören, die direkt an die Plasmamembran gedockt sind. Der andere ist der Reserve-Pool (RP), aus dem die Granula erst zur Plasmamembran mobilisiert werden müssen. Nach dieser Theorie fusionieren in der ersten Phase der Sekretion nur Granula aus dem RRP. Dann sinkt die freigesetzte Insulin-Menge, weil zunächst nicht genug Granula vom RP zum RRP mobilisiert werden können um diesen wieder aufzufüllen. Zum Schluss werden die Granula schneller mobilisiert und der RRP wieder schneller aufgefüllt, sodass die Insulinsekretion wieder steigt (163).

Die zuvor erwähnten Kapazitätsmessungen basieren darauf, dass sich durch die Fusion eines Granulums die Gesamtoberfläche der Membran erhöht und die Kapazität dadurch messbar steigt. Die Messungen der Kapazität bestätigten die Theorie der Pool-Hypothese insofern, dass die Granula-Fusionen bei wiederholter schneller Stimulation immer weniger werden und sich die Gesamtzahl der Fusionen einem Plateau annähert, was einer ersten Phase entsprechen könnte (164). Allerdings ist die Stimulation bei dieser Methode unphysiologisch stark und dauert dafür nur 10 Sekunden.

Die ersten TIRF-mikroskopischen Untersuchungen der Insulin-Granula bestätigten zunächst die bis dahin bestehende Pool-Hypothese. Für die TIRF-Mikroskopischen Untersuchungen werden Granula mit fluoreszierenden Fusionsproteinen markiert und im TIRF-Feld angeregt. Das Besondere ist, dass das Anregungslicht an der Grenzfläche zwischen Deckglas und Zelle

vollständig reflektiert wird. Dadurch bildet sich eine elektromagnetische Welle aus, die evaneszente Welle, die die Fluoreszenz nur innerhalb der ersten 100 - 200 nm der Zelle der anregt (165). Die Auswertung solcher Versuche erfolgte in dem meisten Gruppen durch das Zählen der Exozytosen, die durch das Aufblitzen der Granula erkannt wurden. Diese wurden dann manuell sortiert in Granula, die schon an der Plasmamembran waren (residents) oder Granula, die neu an die Plasmamembran gekommen waren (newcomer). Die so gezählten Exozytosen wurden dann mit den beiden Phasen der Sekretion in Zusammenhang gebracht (166). Allerdings war auch hier die erste Phase deutlich kürzer als die, die bei der Sekretion beobachtet wurde. Ein weiteres Problem war auch die Subjektivität der Auswertung. Mit der gleichen Methodik kam die Gruppe um SEINO später zu dem Ergebnis, dass beide Phasen durch Newcomer-Granula bestimmt sind, was zur Formulierung der „Finite Pool“ Hypothese führte (167). In dieser Hypothese besteht der RRP nicht mehr ausschließlich aus den Granula, die direkt an der Plasmamembran verweilen, sondern hauptsächlich aus Granula außerhalb des TIRF-Feldes. Diese Hypothese setzt allerdings voraus, dass die Granula im RRP nicht nur außerhalb des TIRF-Feldes liegen, sondern trotzdem auch vor dem Aktin-Zytoskelett, das als Barriere in unstimuliertem Zustand den RP zurückhalten soll. Das Aktin-Zytoskelett liegt aber innerhalb des TIRF-Feldes, also näher an der Plasmamembran. Es sind möglicherweise mehr Informationen nötig, um ein genaueres Modell aufzustellen. Ein Problem dieser Arbeiten ist tatsächlich, dass bis dahin nur eine Minderheit der Granula betrachtet wurde, die innerhalb der Messung auch mit der Plasmamembran fusionierte. Die meisten Granula fusionierten allerdings nicht mit der Plasmamembran und wurden so aus der Betrachtung ausgeklammert.

Ein Ansatz, um alle Granula während der Messung zu erfassen, ist die Computer-gestützte Auswertung der TIRF-Daten. Bei dieser werden alle Granula identifiziert und über den Zeitraum der Messung verfolgt. Das bringt einige Vorteile. Zum einen stehen neben den Fusionsereignissen auch Daten zur Mobilität der Granula zur Verfügung. Zum anderen ist die Computer-gestützte Auswertung unabhängig vom Experimentator und so reproduzierbarer und weniger fehleranfällig (168). Mit diesem Ansatz, der bisher nur an MIN6-Zellen durchgeführt wurde, konnte das Modell des Granula-Turnover formuliert werden. Dieses Modell bezieht das erste Mal die Bewegung der Granula zur Plasmamembran und zurück ins Zellinnere mit in die Betrachtung ein (169,170). Bei den Computer-gestützten Untersuchungen wurden einerseits zum ersten Mal alle Granula betrachtet, um ein vollständiges Bild der Granula-Dynamik zu bekommen. Andererseits stimmten die Fusionsraten in den einzelnen MIN6-Zellen nicht mit der Sekretion in den MIN6-Pseudoinseln überein, da die Verwendung von insulinotropen Stimuli, wie 30 mM Glucose oder 40 mM KCl, die Fusionsraten der Granula nicht erhöhte. Das

führt schließlich zu der Frage ob Einzelzellen überhaupt ein geeignetes Modell sein können um die Vorgänge in der Insel abzubilden.



## 2 Fragestellung

### 2.1 Mobilität und Exozytose der submembranären Granula in Beta-Zellen

Die Mobilität und die Exozytose der Insulin-Granula wurden bereits in vorherigen Arbeiten an MIN6-Zellen untersucht. Für die Markierung der Granula wurde das Fusionsprotein hIns-EGFP verwendet. Dabei hatte sich gezeigt, dass es ein fortwährendes Eintreffen und Verschwinden von Insulin-Granula an der Plasmamembran gibt, die Exozytoserate in MIN6 Zellen während der Stimulation jedoch nicht erhöht war und es somit einen wichtigen Unterschied zwischen der Insulinsekretion von MIN6-Pseudoinseln und der Exozytose der Granula in einzelnen MIN6-Zellen gab. Da zuvor gezeigt werden konnte, dass das Granula-Label einen Einfluss auf die Freisetzungskinetik haben kann, ergaben sich folgende Fragestellungen:

- 1) Gibt es Unterschiede zwischen MIN6-Zellen und primären Beta-Zellen bezüglich der Anzahl, der Mobilität und dem Exozytoseverhalten der Granula?
- 2) Sind Mobilität und Exozytoseverhalten in unseren Messungen vom verwendeten Granula-Label abhängig?
- 3) Inwiefern sind die Exozytoseraten der Einzelzellen mit dem Sekretionsverhalten ganzer Inseln vergleichbar?

### 2.2 Einfluss des Aktin-Zytoskeletts auf die Mobilität und die Freisetzung der Insulin-Granula

Dem Aktin-Zytoskelett wurde bisher sowohl eine Funktion als Barriere gegen die unregelte Exozytose als auch eine Funktion als Transportstruktur während der stimulierten Exozytose zugesprochen. Dabei sollte die Stimulation mit Glucose für die Veränderung der Aktin-Struktur und somit auch die Änderung der Aktin-Funktion verantwortlich sein. Diese Auffassung basiert unter anderem auf der Beobachtung eines Aktin-Walls in der Epi-Fluoreszenz, der mit Aktin-modifizierenden Toxinen aufgelöst werden konnte, die auch zu einer Sekretionssteigerung in umströmten Inseln führten. Eine Quantifizierung des Aktin-Zytoskeletts im TIRF-Modus, besonders in Bezug auf Veränderungen der Aktin-Struktur durch einen Glucose-Stimulus, gab es allerdings noch nicht. Dementsprechend ergaben sich folgende Fragen:

- 1) Welchen Einfluss hat das Aktin-Zytoskelett auf die Mobilität und die Freisetzung der Insulin-Granula?
- 2) Kann die räumliche Beziehung zwischen den Insulin-Granula und dem Aktin-Zytoskelett im TIRF-Feld sowie die Abhängigkeit dieser Beziehung von einem Glucose-Stimulus quantifiziert und auf einen numerischen Wert kondensiert werden?

### **2.3 Dynamische Bestimmung der ATP/ADP-Ratio in Beta-Zellen**

Die Messung der, für die Auslösung der Insulinsekretion zentral wichtigen, ATP/ADP-Ratio wurde bisher hauptsächlich in Form sogenannter Endpunktmessungen durchgeführt, bei denen die Zellen für die Messung lysiert werden mussten. Mit PercevalHR stand ein neuer Fluoreszenzindikator zur Verfügung, mit dem die dynamische Messung der ATP/ADP-Ratio möglich wurde. Mit diesem Indikator sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- 1) Kann die ATP/ADP-Ratio mit PercevalHR in einzelnen Beta-Zellen dynamisch dargestellt werden?
- 2) Gibt es Unterschiede in der ATP/ADP-Ratio zwischen MIN6-Zellen und Beta-Zellen?
- 3) Können auf der Ebene der ATP/ADP-Ratio Unterschiede zwischen verschiedenen metabolischen und nicht-metabolischen Stimuli dargestellt werden?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Verwendete Chemikalien, Reagenzien, Enzyme und Zellkulturmedien

Tabelle 3.1: Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Agar-Agar Kobe I, (Pulver)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Agarose low EEO	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Albumin [Pentex <sup>®</sup> , Bovine Albumi Fraction V]	MILES (Kankakee, USA)
Ammoniumchlorid	Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Calciumchlorid-Dihydrat	E. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Carbogen-Gas (95% O <sub>2</sub> , 5% CO <sub>2</sub> )	Westfalen (Göttingen, Deutschland)
CO <sub>2</sub> -Gas	Westfalen (Göttingen, Deutschland)
Collagenase NB 8 Broad Range	SERVA Electrophoresis (Heidelberg, Deutschland)
Collagenase P	Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
DMSO ≥ 99,9%	Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
EGTA	Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
Essigsäure 96%	E. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol, entwässert, vergällt mit 1% Petrolether	Berkel AHK Alkoholhandel (Ludwigshafen, Deutschland)?
Ethidiumbromidlösung (Tropfflasche)	0,025% Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
FBS, Heat Inactivated	Life Technologies (Darmstadt, Deutschlad)
FCS Gold ADD chromatographiert mit Additiven	Bio & Sell (Feucht, Deutschland)
Fura-2 LeakRes (AM)	Teflabs (Austin, USA)

Bezeichnung	Hersteller
D(+)-Glucose-Monohydrat	E. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Hefeextrakt, (Pulver), für die Bakteriologie	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
HEPES	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Immersionsöl [ImmersoI™ 518 F]	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Isopropanol	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat	E. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumhydroxid, (Plätzchen)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Kanamycinsulfat	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ketoisocapronsäure-Natriumsalz	Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
L-Glutamin 200 mM (100x)	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) [Gibco]
Lipofactamine® 2000 Reagent	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) [Invitrogen]
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	E. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumazid	Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
Natriumchlorid	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat	E. Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydroxid, (Plätzchen)	E. Merck (Darmstadt, Deutschland)
PBS [Dulbecco's PBS (10x)] (ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> )	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
Pen/Strep 10000 Units/mL Penicillin 10000 Units/mL Streptomycin	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) [Gibco]
Pepton aus Fleisch, für die Mikrobiologie	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
5-(and-6)-carboxy SNARF®-1, (AM), Acetat	Thermo Fischer Scientific (Massachusetts, USA)
Stickstoff, (flüssig)	Linde (Pullach, Deutschland)
TMRE	AnaSpec (Fremont, USA)
Tris Pufferqualität	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)

Bezeichnung	Hersteller
Trypsin [0,05% Trypsin-EDTA (1x)]	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) [Gibco]
Trypanblau, für Mikroskopie	Riedel-de Haën (Seelze, Deutschland)

Tabelle 3.2: Zellkulturmedien

Bezeichnung	Hersteller
DMEM (4,5 g/L Glucose, (+)-L-Glutamin, (-)-Pyruvat)	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) [Gibco]
DMEM (4,5 g/L Glucose, (+)-L-Glutamin, (+)-Pyruvat)	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) [Gibco]
LB-Medium für die Molekularbiologie, (Pulver)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Opti-Mem <sup>®</sup> I (1x)	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) [Gibco]
RPMI-Medium 1640 ohne Glucose, (Pulver)	GIBCO BRL (Paisly, Schottland)

Tabelle 3.3: Enzyme für die Molekularbiologie

Bezeichnung			Hersteller
<i>AgeI</i>			New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
<i>BamHI</i>			New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
<i>BglII</i>			New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
<i>Eco321</i>			New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
<i>EcoRI</i>			New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
FastAP™	Thermosensitive	Alkaline	Thermo Fischer Scientific (Wilna, Litauen)
Phosphatase			
Klenow-Enzym			New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
<i>NheI</i> -HF			New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
<i>NotI</i>			New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
<i>NotI</i> -HF			New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
<i>PmeI</i>			New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
<i>SpeI</i>			New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
<i>SpeI</i> -HF			New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
T4-DNA-Ligase			Thermo Fischer Scientific (Wilna, Litauen)
<i>XbaI</i>			New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
<i>XhoI</i>			New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)

## 3.2 Gewinnung primärer Zellen aus der Maus

### 3.2.1 Versuchstiere

Die verwendeten primären Zellen (Inseln + einzelne Beta-Zellen) stammten von NMRI-Mäusen aus eigener Züchtung. Diese waren weiblich und zwischen 12 und 14 Wochen alt. Die Temperatur in den Haltungsräumen war 19 – 21 °C bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden. Dabei standen Wasser und Nahrung (Ssniff, Artikelnummer: V1554-000, Ratte/Maus 10 mm, Phytoöstrogenarm) zur freien Verfügung bereit. Ein Einstreuwechsel erfolgte ein bis zwei Mal pro Woche.

### 3.2.2 Herstellung der Lösungen zur Isolierung und Kultivierung der Langerhans'schen Inseln und der primären Beta-Zellen

#### Krebs-Ringer Lösung:

Die Krebs-Ringer Lösung wurde aus den vorbereiteten Stammlösungen (**Tabelle 3.4**) hergestellt. Zur Vorbereitung der Stammlösungen eins bis sechs wurden die entsprechenden Salze in doppelt destilliertem Wasser (H<sub>2</sub>O bidest.) gelöst und konnten dann bis zu vier Wochen im Kühlschrank gelagert werden. Für die Stammlösung sieben wurden zunächst sowohl Albumin als auch HEPES in einem Teil H<sub>2</sub>O bidest. gelöst, dabei musste NaOH (1 Mol/L) verwendet werden um HEPES zu lösen. Dann wurden beide Teillösungen vereint und mit H<sub>2</sub>O bidest. auf das entsprechende Endvolumen aufgefüllt. Für die Lagerung wurde die Lösung zu jeweils 20 mL aliquotiert und bei -20 °C in den Gefrierschrank gestellt.

Vor dem Mischen der Krebs-Ringer Lösung wurden zuerst alle Stammlösungen aus dem Kühlschrank genommen und auf Raumtemperatur erwärmt. Dann wurden zunächst die Lösungen eins bis sechs gemischt und für 30 Minuten mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) begast um den pH-Wert einzustellen und die Lösung mit Sauerstoff zu sättigen. Zum Schluss wurde die Lösung sieben und 5 mM Glucose (0,99 mg/mL) hinzugefügt. Die Krebs-Ringer Lösung wurde dann sofort für die Zell- oder Inselisolierung verwendet.

Tabelle 3.4: Konzentration der Salze in den Stammlösungen und in der Krebs-Ringer-Lösung

Stammlösungen	Konzentration in der Stammlösung	Konzentration in der Krebs-Ringer Lösung
<b>Lösung 1</b>	154 mM NaCl	118,5 mM NaCl
<b>Lösung 2</b>	154 mM KCl	4,7 mM KCl
<b>Lösung 3</b>	110 mM CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	2,5 mM CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O
<b>Lösung 4</b>	154 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>Lösung 5</b>	154 mM MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	1,2 mM MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O
<b>Lösung 6</b>	154 mM NaHCO <sub>3</sub>	20,1 mM NaHCO <sub>3</sub>
<b>Lösung 7</b>	154 mM NaOH, 324,5 mM HEPES, (ggf.: 6.5%(m/m) Albumin)	4,7 mM NaOH, 10 mM HEPES, (ggf.: 0,2%(m/m) Albumin)

Calcium-freie Lösung

Diese Lösung ist eine Abwandlung der Krebs-Ringer Lösung. Die Zusammensetzung und die Unterschiede zur Krebs-Ringer Lösung sind in **Tabelle 3.5** dargestellt. Sie wurde verwendet um aus den Langerhans'schen Inseln Einzelzellen zu gewinnen. Das fehlende Ca<sup>2+</sup> und das selektiv Ca<sup>2+</sup>-komplexierende EGTA sorgten dabei dafür, dass kein Ca<sup>2+</sup> zur Verfügung stand um die Zell-Zell-Kontakte innerhalb der Insel aufrecht zu erhalten. Die fehlenden Ionen in der Lösung wurden durch eine Erhöhung der NaCl-Konzentration kompensiert.

Tabelle 3.5: Herstellung Ca<sup>2+</sup>-freier Krebs-Ringer-Lösung

Stoff	Einwaage	Konzentration in der Ca <sup>2+</sup> -freien Lösung
NaCl	7,89 mg/mL	135 mM
KCl	0,36 mg/mL	4,8 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,16 mg/mL	1,2 mM
MgSO <sub>4</sub>	0,29 mg/mL	1,2 mM
HEPES	5,96 mg/mL	25 mM
BSA	10 mg/mL	1%(m/m)
Glucose	0,59 mg/mL	3 mM
EGTA	0,19 mg/mL	0,5 mM



### RPMI Lösungen:

Das RPMI-Medium wurde als Feststoff (RPMI 1640) bezogen. Diesem war bereits L-Glutamin zugesetzt, allerdings noch keine Glucose und kein  $\text{NaHCO}_3$ . Für 1 L Medium wurden 8,4 g RPMI 1640, 2 g  $\text{NaHCO}_3$  (24 mM) und je nach erforderlicher Glucose-Konzentration entweder 0,99 g (5 mM) oder 1,98 g (10 mM) Glucose in 900 mL  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. gelöst. Als nächstes wurden 10 mL Pen/Strep (100 UG/mL) hinzugefügt und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Nachdem das Medium auf 900 mL mit  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. aufgefüllt wurde, konnte es zu 45 mL oder 90 mL aliquotiert und im Kühlschrank gelagert werden. Vor dem Gebrauch wurde dem Medium 10 Vol.-% FCS zugesetzt. Nach der Zugabe von FCS wurde das Medium maximal eine Woche lang verwendet.

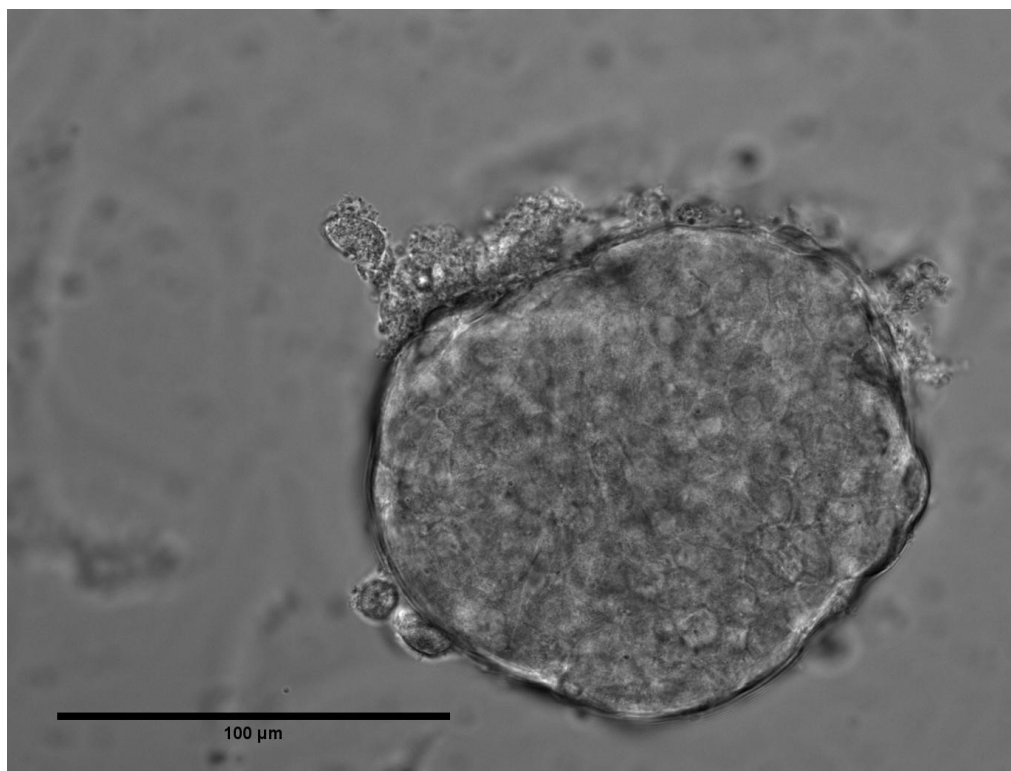
### **3.2.3 Isolierung und Kultivierung der Langerhans'schen Inseln**

Um im späteren Verlauf das Pankreas verdauen zu können, musste zuerst Collagenase in ein kleines Glasgefäß eingewogen werden. In einem weiteren Gefäß wurde eine entsprechende Menge der vorher vorbereiteten Krebs-Ringer Lösung auf Eis gekühlt. Dabei sollten etwa 2 mL Lösung mit einer Collagenase-Aktivität von 1,4 U/min herauskommen, sobald beides gemischt wird. In einem dritten Glasgefäß wurden noch 3 mL Krebs-Ringer Lösung abgefüllt und ebenfalls auf Eis gelagert.

Für die Isolierung eines Pankreas musste zuerst eine Maus getötet werden, indem ihr die Halswirbelsäule mit einer chirurgischen Schere durchtrennt wurde. Danach wurde der Bauchraum geöffnet, das Pankreas entnommen und in das vorbereitete Gefäß mit 3 mL Glucose überführt. Dort wurde es vom restlichen Fettgewebe befreit und in das zweite Gefäß mit ca. 2 mL Krebs-Ringer Lösung überführt. In diesem wurde das Pankreas mechanisch mit einer Schere zerkleinert und mit einer Pipette zur abgewogenen Collagenase gegeben. Das zerkleinerte Pankreas wurde 10 Minuten bei 37 °C im Schüttelbad (328 rpm) verdaut. Der Verdau konnte dann durch Zugabe von kalter Krebs-Ringer Lösung und anschließendes kräftiges Schütteln gestoppt werden. Nachdem sich die schweren Bestandteile des Pankreas am Boden abgesetzt hatten, wurde die überstehende Lösung abgesaugt. Dann wurde erneut mit kalter Krebs-Ringer Lösung aufgefüllt, geschüttelt und alles zum Isolieren der Langerhans'schen Inseln in eine geschwärzte Schale gegeben. Die Isolierung fand unter einem Stereomikroskop (Fa. Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland, mit Lampe KL 1500 electronic, Fa. Schott, Mainz, Deutschland) mit Hilfe einer Pipette statt. Gegebenenfalls mussten die Inseln noch mit Kanülen von exokrinem Gewebe befreit werden. Die isolierten Inseln wurden im

nächsten Schritt zweimal mit Krebs-Ringer-Lösung gewaschen um die Reste der Collagenase und des exokrinen Gewebes zu entfernen und dann entweder direkt für Perfusionen verwendet oder, für die spätere Kultivierung, in RPMI-Medium mit 10 mM Glucose überführt.

Um die isolierten Inseln in späteren Versuchen unter dem Fluoreszenzmikroskop zu betrachten, wurden sie auf Deckgläschen (Durchmesser: 28 mm, Stärke: 0,16 – 0,19 mm, Fa. Gerhard Menzel, Braunschweig, Deutschland) gesetzt. Hierfür wurden die Deckgläschen zuerst in kleine Petrischalen (Nocken; Durchmesser: 3,5 cm) gelegt und mit Collagen beschichtet. Das gelang durch das Verreiben und Eintrocknen von 2  $\mu$ L Collagen mit 20  $\mu$ L RPMI in der Mitte des Deckgläschens. Auf den so entstandenen Collagen-Fleck konnten dann jeweils zwei bis drei Inseln in 40  $\mu$ L RPMI (10 mM Glucose) gesetzt werden. Diese sind dann für drei Stunden im Brutschrank (CO<sub>2</sub> Inkubator, MCO-18 AIC (UV), Fa. Sanyo, Moriguchi, Japan) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> angewachsen. Zuletzt wurden noch jeweils 3 mL RPMI-Medium (5 mM Glucose) langsam in die Petrischalen gegeben. So konnten die Inseln, bis zur Verwendung nach zwei bis vier Tagen, im Brutschrank kultiviert werden.



**Abbildung 3.1: Durchlichtbild einer NMRI-Maus-Insel**

Maßstabsbalken = 100  $\mu$ m

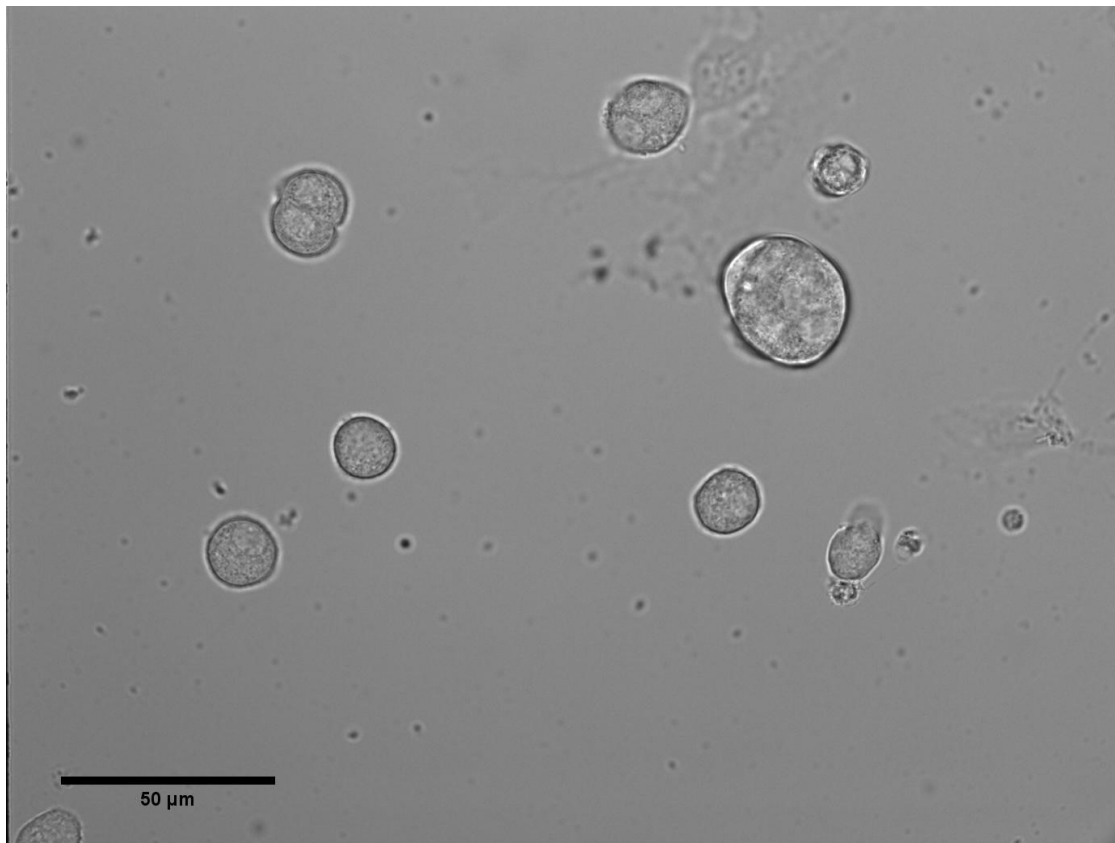
### 3.2.4 Isolierung und Kultivierung primärer Beta-Zellen

Bei der Isolierung der Inseln zur Herstellung der einzelnen Beta-Zellen gab es einige Unterschiede bezüglich der Herstellung der Krebs-Ringer Lösung und des Verdaus des Pankreas. So wurden für die Herstellung der Krebs-Ringer Lösung keine Stammlösungen hergestellt, sondern die entsprechenden Stoffe direkt abgewogen und nacheinander in der entsprechenden Menge H<sub>2</sub>O bidest. gelöst. Danach wurde, unter Verwendung von HCl (1 M), mit einem pH-Meter (Labor-pH-Meter, Fa. Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland) der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde dann steril filtriert, gebrauchsfertig zu 100 mL aliquotiert und bei 4 °C gelagert. Für den Verdau wurde hier die Injektionsmethode gewählt, für die ca. 3 mL einer Krebs-Ringer Lösung mit Collagenase (Aktivität: 1.4 U/min) vorbereitet und auf Eis gelagert wurde.

Das Töten der Maus erfolgte wie zuvor beschrieben mit der Durchtrennung der Halswirbelsäule. Dann wurde die Maus auf einer Korkplatte fixiert und der Bauchraum geöffnet. Um im nächsten Schritt die vorbereitete Collagenase-Lösung in das Pankreas einspritzen zu können, musste der Gallengang freigelegt und dort abgeklemmt werden, wo er in den Dünndarm mündet. Beim Einspritzen der Lösung in den Gallengang sollte sich das Pankreas dann mit der Collagenaselösung füllen und sich dabei deutlich vergrößern. Das Pankreas wurde dann entnommen und in ein konisches Röhrchen (10 mL) überführt und bis zum Verdau auf Eis gestellt. Der Verdau erfolgte bei 37 °C im Wasserbad, dabei wurde das Röhrchen die ersten 8 Minuten und 15 Sekunden nicht bewegt und dann 45 Sekunden geschüttelt. Danach wurden sofort 6 mL kalte Krebs-Ringer Lösung hinzugefügt um den Verdau zu beenden. Die Suspension wurde im Folgenden zentrifugiert (300 g, 15 sec) (Heraeus Biofuge Primo R, Fa. Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland), der Überstand entfernt und das Pellet wieder in 9 mL kalter Krebs-Ringer Lösung geschüttelt. Diese Schritte wurden zwei Mal durchgeführt, bevor die Suspension für die Isolierung der Langerhans'schen Inseln in eine geschwärzte Schale überführt wurde. Die Isolierung und das Waschen der Inseln erfolgten wie zuvor beschrieben. Die isolierten Inseln wurden dann in ein konisches Schälchen pipettiert und von dort aus in 5 mL Calcium-freie Lösung in einem konischen Röhrchen überführt um die Zell-Zell-Kontakte innerhalb der Langerhans'schen Inseln aufzulösen und so Einzelzellen oder kleine Zellcluster zu erhalten. Die Inseln blieben zehn Minuten in der Ca<sup>2+</sup>-freien Lösung, wobei die Lösung drei Mal jeweils eine Minute mit dem Vortex (2500 rpm, MS2 Minishaker, Fa. Ika®-Werke, Staufen, Deutschland) durchmischt wurde. Dies geschah zu Beginn, nach fünf Minuten und am Ende. Die so erhaltenen Einzelzellen wurden dann erneut zentrifugiert (160 g, 1 min), der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 5 mL RPMI-

Medium (10 mM Glucose) resuspendiert. Danach wurde erneut zentrifugiert (160 g, 1 min), der Überstand entfernt und das Pellet erneut in RPMI (10 mM Glucose) aufgenommen. Dabei wurden 15  $\mu$ L RPMI pro 10 – 15 Inseln verwendet.

Wie die Inseln mussten auch die Einzelzellen für die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung auf Deckgläschen anwachsen. Dafür wurden die Deckgläschen in eine 6-Well-Platte gelegt, eine Beschichtung war nicht notwendig. Mittig auf jedes Deckgläschen wurden dann 15  $\mu$ L der vorbereiteten Zellsuspension gegeben. Die Zellen konnten dann für zweieinhalb Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> anwachsen. Anschließend wurde in jedes Well 3 mL RPMI-Medium (5 mM Glucose) langsam hinzu pipettiert. Die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung im Brutschrank kultiviert.



**Abbildung 3.2: Durchlichtbild einzelner Beta-Zellen und Zell-Clustern aus einer NMRI-Maus**

Maßstabsbalken = 50  $\mu$ m

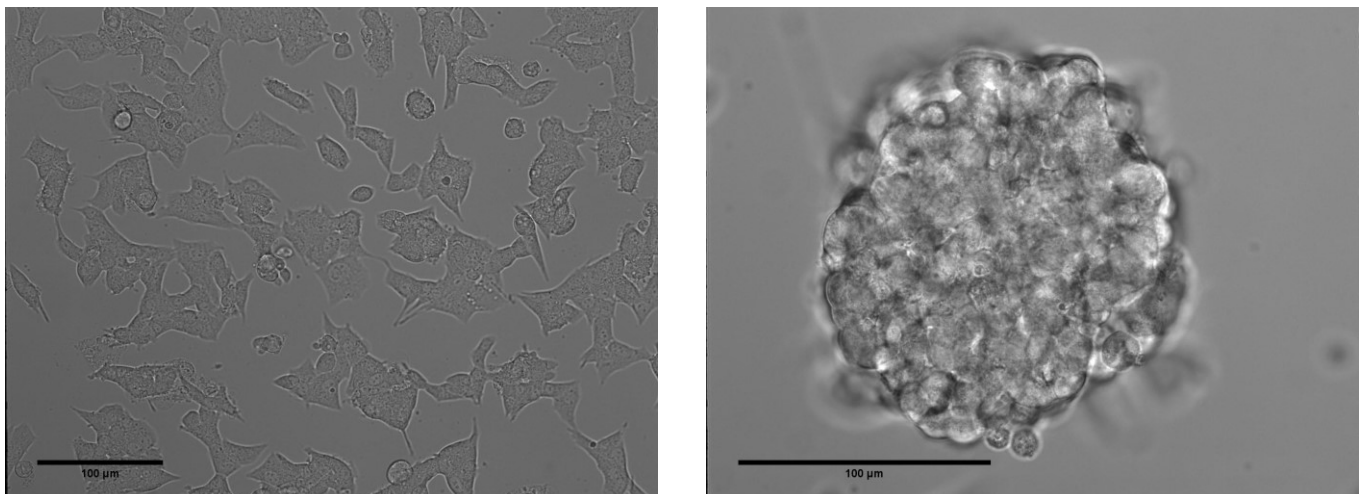
### 3.3 Zellkultur

Neben den Inseln und primären Einzelzellen aus der Maus wurden auch Zelllinien verwendet. Darunter die Insulin-produzierende Maus-Zelllinie MIN6, die in Versuchen bzw. zum Testen von Farbstoffen und fluoreszierenden Proteinen verwendet wurde, und die humane Zelllinie AD293, die für die Produktion und Vermehrung von Viren benötigt wurde.

#### 3.3.1 MIN6-Zellen

Die MIN6-Zelllinie wurde erstmals 1990 von MIYOSAKI ET. AL. beschrieben, die Bezeichnung MIN6 steht für Mouse Insulinoma Subclone 6 (171). Wie der vollständige Name vermuten lässt, stammen die Zellen dieser Zelllinie aus Insulinomen transgener Mäuse. Bei diesen Mäusen wurde der Insulinpromotor an das SV40T-Antigen gekoppelt, welches ein starkes Protoonkogen ist und die Entstehung von Tumoren begünstigt. Die so entstandenen Insulin-produzierenden MIN6-Zellen werden als Modell für Beta-Zellen verwendet.

Die Besonderheit der MIN6-Zellen im Vergleich zu anderen Insulin-produzierenden Zelllinien (wie zum Beispiel INS1-Zellen) ist, dass sie in der Lage sind sich zu größeren inselähnlichen drei-dimensionalen Zellverbänden, den sogenannten Pseudoinseln, zusammenzulagern. Dabei bilden sie, wie in primären Inseln, in allen Dimensionen Zell-Zell-Kontakte aus. Dadurch sind MIN6-Zellen ein gutes Modell um vergleichende Experimente an Einzelzellen und Zellverbänden durchzuführen und können so auch bei der Bewertung von Versuchen mit primären Inseln im Vergleich mit primären Einzelzellen helfen.



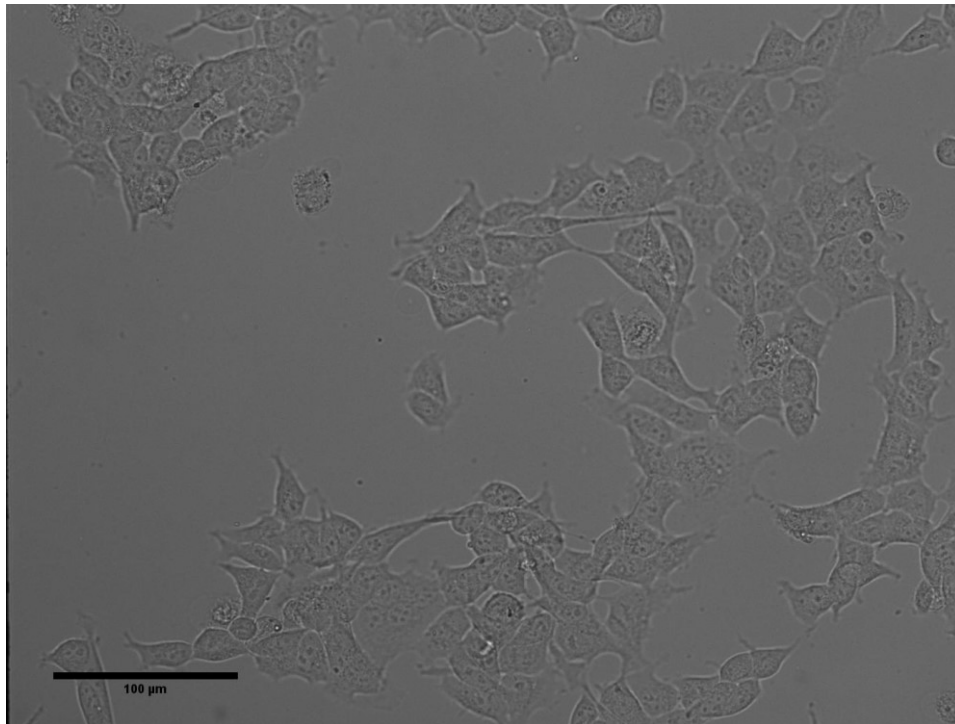
**Abbildung 3.3: Durchlichtbilder einzelner MIN6-Zellen (links) und einer MIN6-Pseudoinsel (rechts)**

Maßstabsbalken = 100 µm

### 3.3.2 AD293-Zellen

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine veränderte Form der humanen HEK293-Zelllinie. Die HEK293-Zelllinie (Human Embryonic Kidney) besteht aus embryonalen Nierenzellen, die mit Adenovirus Typ 5 DNA transformiert wurden (172).

Wie die HEK293-Zellen tragen auch die AD293-Zellen das adenovirale E1-Gen. Dieses kodiert für die E1A- und E1B-Proteine von Adenoviren und ist essenziell für die Produktion neuer Viren in der Wirtszelle. Der Vorteil bei der Virenproduktion in AD293-Zellen gegenüber der in HEK293-Zellen ist die bessere Adhäsion an Zellkulturplatten, was die Handhabung in der Zellkultur erleichtert. So zeigen die AD293-Zellen eine abgeflachte Form und haben dadurch eine größere Zelloberfläche, was die Transfektionseffizienz erhöht (173).



**Abbildung 3.4: Durchlichtbild einzelner AD293-Zellen**

Maßstabsbalken = 100 µm

### 3.3.3 Steriles Arbeiten

Bei der Arbeit mit Zellkulturen ist es besonders wichtig steril zu arbeiten um mögliche Kontaminationen der Kulturen zu vermeiden. Das gilt im Besonderen für die Arbeiten mit den AD293-Zellen, da dort kein Antibiotikum im Medium verwendet wurde, weil dieses die Virenproduktion gestört hätte.

Zum sterilen Arbeiten gehörte auch die Verwendung von sterilen Arbeitsmaterialien. Diese wurden entweder in Form von Einmalmaterialien steril gekauft (Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Fa. Greiner Bio-One, Frickenhausen, Fa. Eppendorf, Hamburg, alle in Deutschland) oder mussten noch sterilisiert werden. Das geschah in der Regel für 40 Minuten bei 180 °C im Sterilisator (MOV-212S, Fa. SANYO Electric Biomedical Co., Moriguchi City, Japan) oder, wenn Materialien verwendet wurden, die weniger beständig waren, im Autoklaven für 30 Minuten bei 121°C. Die Durchführung der Arbeiten erfolgte unter einer sterilen Werkbank der Klasse 2 (Heraeus HeraSafe 12, Fa. Kendro Laboratory Products, Langenselbold, Deutschland) und alle Materialien wurden mit 80%igem Ethanol desinfiziert bevor sie in die Werkbank eingebracht wurden.

### **3.3.4 Verwendete Medien und Lösungen für die Zellkultur**

#### PBS

Das verwendete PBS wurde zehnfach konzentriert bezogen und im Kühlschrank gelagert. Daraus konnte nach Bedarf einfach konzentriertes PBS hergestellt werden, das ebenfalls im Kühlschrank gelagert wurde.

#### Kulturmedium für MIN6-Zellen

Als Basis diente 500 mL DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium) mit 4,5 g/L Glucose (entspricht 25 mM) und 4 mM Glutamin. Dieser wurde 5 mL L-Glutamin (200 mM) und 5 mL einer Lösung mit Penicillin und Streptomycin (Pen/Strep) mit 10000 U/mL beziehungsweise 10000 µg/mL hinzugefügt. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank. Nach frischer Zugabe von 10 Vol% FCS konnte das gebrauchsfertige Medium ca. eine Woche verwendet und im Kühlschrank gelagert werden. Dieses Medium wurde für alle nachfolgend beschriebenen Zellkulturschritte verwendet, wenn sie mit MIN6-Zellen durchgeführt wurden.

#### Kulturmedium für AD293-Zellen

Auch für diese Zellen wurde DMEM verwendet. Dieses enthielt bereits 4,5 g/L Glucose (entspricht 25 mM), 4 mM Glutamin und 1 mM Natriumpyruvat. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank. Nach frischer Zugabe von 10 Vol% FCS konnte das gebrauchsfertige Medium ca. eine Woche verwendet und im Kühlschrank gelagert werden. Dieses Medium wurde für alle nachfolgend beschriebenen Zellkulturschritte verwendet, wenn sie mit AD293-Zellen durchgeführt wurden.

### **3.3.5 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen**

Zur effizienten und bedarfsorientierten Nutzung der beiden Zelllinien war es möglich, diese durch Kryokonservierung langfristig zu lagern und bei Bedarf wieder aufzutauen. Das war unter anderem nötig, weil die verwendeten Zelllinien nur eine gewisse Zeit (bis zu einer gewissen Anzahl an Zellpassagen) verwendet werden konnten, da sich die Eigenschaften der Zellen mit jeder Passage ändern konnten und sich die Zellen so irgendwann von den anfangs verwendeten unterschieden.

#### **3.3.5.1 Kryokonservierung**

Für die Kryokonservierung mussten zwei spezielle Medien (Einfriermedium, DMSO-Medium) frisch vorbereitet werden.

##### Einfriermedium

Zur Herstellung des Einfriermediums wurden 20 Vol% FCS zum entsprechenden DMEM hinzugegeben.

##### DMSO-Medium

Die Basis für das DMSO-Medium war ebenfalls DMEM. Diesem wurde 20 Vol% FCS und 10 Vol% DMSO hinzugefügt.

Im Folgenden ist die Kryokonservierung einer Zellkulturflasche (25 cm<sup>2</sup>, 50 mL) beschrieben. Die für die Kryokonservierung verwendeten Zellen sollten ca. 90% konfluent gewachsen sein. Zuerst wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 3 mL PBS gewaschen und dann mit 3 mL einer 0,05%igen Trypsin-Lösung im Brutschrank (2 min, 37 °C) von der Flasche abgelöst. Der Verdau wurde mit 5 mL DMEM gestoppt und die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen transferiert. Die folgende Zentrifugation war abhängig von den Zellen, die konserviert werden sollten. Die MIN6-Zellen wurden 3 min bei 310 g und die AD293-Zellen 4 min bei 420 g zentrifugiert (EBA20, Fa. Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland). Nach dem Absaugen des Mediums wurde das Pellet mit 2 mL Einfriermedium resuspendiert. An diesem Punkt konnten die Zellen mehrerer Flaschen zusammengeführt werden. Im nächsten Schritt wurde der Zellsuspension im Einfriermedium die gleiche Menge DMSO-Medium langsam hinzugefügt und geschwenkt bis keine Schlieren mehr zu sehen waren. Nach einer 30-minütigen Equilibrierung bei Raumtemperatur konnte der Prozess des Einfrierens in einem speziellen Gefrierbehälter (Mr. Frosty<sup>TM</sup> Gefrierbehälter, Fa. Thermo Fisher Scientific, Wilna



Litauen) gestartet werden. Dieser wurde entsprechend der Herstelleranleitung mit Schaumstoff ausgekleidet und mit 100% Isopropanol gefüllt. Dann wurde die Zellsuspension langsam mit einer serologischen Pipette zu jeweils 1,8 mL in Kryoröhrchen aliquotiert, die in die Halterung des Gefrierbehälters eingesetzt wurden. Das Einfrieren erfolgte danach in zwei Schritten. Im ersten Schritt lagerten die Zellen zunächst vier Stunden bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , danach folgte die Langzeitlagerung bei  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **3.3.5.2 Auftauen der Zellen**

Die vorher eingefrorenen Kryoröhrchen mit der Zellsuspension wurden bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad schnell aufgetaut und dann vorsichtig mit einer serologischen Pipette in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der langsamen Zugabe von 5 mL DMEM erfolgte die Zentrifugation (130 g, 5 min). Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 6 mL DMEM resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Diese wurde für 24 Stunden im Brutschrank kultiviert ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ , 95 % Luftfeuchtigkeit), dann erfolgte der erste Medienwechsel.

#### **3.3.6 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität der Zellen**

Die Anzahl und die Vitalität der Zellen wurde mit der Neubauer Zählkammer bestimmt. Hierfür konnte entweder nur die Zellsuspension in die Kammer gegeben werden um die Zellen in den vier großen dreifach umrandeten Quadraten auszuzählen. Die durchschnittliche Zellzahl der Quadrate wurde dann mit  $10^4$  multipliziert um die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension zu erhalten. Alternativ konnte die Zellsuspension auch zu gleichen Teilen mit Trypanblau gemischt und für eine Minute inkubiert werden um gleichzeitig die Vitalität der Zellen zu bestimmen. Dabei nahmen die toten Zellen den Farbstoff auf und erschienen im Mikroskop blau. Bei der Berechnung der Zellzahl musste allerdings beachtet werden, dass die Verdünnung mit Trypanblau mit einberechnet werden musste. So wurde die durchschnittliche Zellzahl der Quadrate in diesem Fall erst mit zwei und dann mit  $10^4$  multipliziert um die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension zu erhalten.

### 3.3.7 Kultivieren und Passagieren der Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>, 50 mL). Um die Zellen zu Passagieren, wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 3 mL PBS gewaschen und dann mit 3 mL einer 0,05%igen Trypsin-Lösung im Brutschrank (2 min, 37 °C) vom Flaschenboden abgelöst. Der Verdau wurde mit 5 mL DMEM gestoppt und die Zellsuspension in ein Zentrifugen-Röhrchen überführt. Die Zentrifugation erfolgte abhängig von der Zelllinie, so wurden MIN6-Zellen 3 min bei 310 g und AD293-Zellen 4 min bei 420 g zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes konnten die Zellen dann mit 4 mL DMEM resuspendiert und erneut, in Abhängigkeit von der Zell-Art, auf neue Zellkulturflaschen verteilt werden. Die MIN6-Zellen wurden in der Verdünnung 1:2 oder 1:4 und die sich schneller teilenden AD293-Zellen in der Verdünnung 1:5 oder 1:10 geteilt. Das bedeutet für das Beispiel einer 1:2-Teilung, dass die Hälfte der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche gegeben wurde, die dann bis zu einem Volumen von 6 mL mit DMEM aufgefüllt wurde. Nach zwei Tagen erfolgte ein Medienwechsel und nach vier Tagen war ein erneutes Passagieren der Zellen nötig.

### 3.4 Gentransfer in MIN6-Zellen und primäre Beta-Zellen

Das Ziel eines solchen Gentransfers war es, dass die verwendeten Zellen bestimmte Fusionsproteine über die Proteinbiosynthese herstellen. Im Folgenden ist kurz aufgeführt welche Gene, die für diese Fusionsproteine kodieren, in die Zellen transferiert wurden und für welche Fragestellung dies geschah. Außerdem wird ihre Funktionsweise kurz beschrieben.

#### Markierung der Insulin Granula

Für die Markierung der Insulin-Granula wurden Fusionsproteine verwendet, bei denen ein natürlich im Granulum lokalisiertes Protein mit einem Linker an ein fluoreszierendes Protein gekoppelt war. So wurden die fluoreszierenden Proteine EGFP (grün) und tdimer (rot) carboxy-terminal an das humane Insulin (hIns) gekoppelt und die fluoreszierenden Proteine emGFP (grün) und mCherry (rot) in das murine c-Peptid (mIns-c-Peptid) integriert. Dadurch war es mittels TIRF-Mikroskopie möglich, die Granula in den Zellen zu lokalisieren und sowohl ihre Bewegung an der Plasmamembran als auch ihr Verhalten vor und während der Exozytose zu beobachten.

#### Markierung des Aktin-Zytoskeletts

Zur Markierung des Aktins wurde Lifeact an den N-Terminus des fluoreszierenden Proteins tagRFP fusioniert. Das Lifeact besteht aus den ersten 17 Aminosäuren des Proteins ABP 140 und ist auch für dessen Fähigkeit Aktin zu binden verantwortlich (174). Im Experiment sorgte es dafür, dass das fluoreszierende Fusionsprotein (Lifeact-tagRFP) reversibel an Aktin binden konnte ohne die Dynamik des Aktins selbst zu beeinflussen. So konnte die Dynamik des Aktins an der Plasmamembran mittels TIRF-Mikroskopie beobachtet werden.

#### Messung des ATP/ADP Verhältnisses

Das dynamische Verhältnis von ATP zu ADP in lebenden Zellen wurde mit Hilfe von PercevalHR beobachtet. Hierbei handelt es sich um eine Weiterentwicklung des für den gleichen Zweck hergestellten Perceval (175). Der Vorteil des PercevalHR ist dabei, dass hiermit Messungen im Bereich physiologischer ATP-Konzentrationen möglich sind. Bei PercevalHR handelt es sich um ein Fusionsprotein, das aus einer ATP-bindenden Domäne und einer Reporterdomäne besteht. Die Reporterdomäne ist das fluoreszierende Protein Venus, das zirkulär permutiert wurde (cpmVenus). Die ATP-bindende Domäne ist ein Homotrimer des Proteins GlnK aus dem zwei von drei ATP-Bindestellen entfernt wurden. Im Experiment war das Fusionsprotein in der Lage mit der ATP-bindenden Domäne mit hoher Affinität sowohl ATP zusammen mit  $Mg^{2+}$  als auch ADP zu binden. Die Konformation änderte sich je nach

Bindungspartner stark, was zu einer Konformationsänderung im cpmVenus und damit zu veränderten Fluoreszenzeigenschaften führte.

### **3.4.1 Verwendete Puffer und Lösungen für die molekularbiologischen Arbeiten**

Für die Herstellung von Plasmiden und Viren für den Gentransfer in die verschiedenen verwendeten Zellen waren einige mikrobiologische Schritte nötig, für die folgende Puffer und Lösungen hergestellt werden mussten.

#### Ampicillin-Lösung

Es wurden 100 mg/mL Ampicillin-Na in H<sub>2</sub>O bidest. gelöst, zu 200 µL aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### Kanamycin-Lösung

Es wurden 50 mg/mL Kanamycin-Sulfat in H<sub>2</sub>O bidest. gelöst, zu 200 µL aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### LB-Medium/LB-Platten

Zur Herstellung des LB-Mediums wurden 5 g pulverförmiges LB-Medium für die Molekularbiologie in 200 mL H<sub>2</sub>O bidest. gelöst. Das Medium wurde anschließend autoklaviert und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert.

Für die LB-Platten wurde zusätzlich zum LB-Medium noch 3 g Agar-Agar gelöst. Nach dem Autoklavieren musste die Lösung zunächst auf 60 °C abkühlen, danach konnte noch 200 µL einer Antibiotika-Lösung (Ampicillin oder Kanamycin) hinzugefügt werden. Die Platten wurden warm gegossen, wobei jeweils 20 mL Lösung pro Platte mit dem Durchmesser von 10 cm verwendet wurde. Auch die Platten wurden nach dem Aushärten im Kühlschrank gelagert.

#### SOC-Medium

Für das SOC-Medium wurden 2% Pepton aus Fleisch, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl und 2,5 mM KCl in H<sub>2</sub>O bidest. gelöst. Die Prozentangaben bezogen sich dabei auf das Gewicht des fertigen Mediums. Der pH-Wert der Lösung wurde dann mit NaOH auf 7,0 eingestellt, danach wurde sie autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf 60 °C erfolgten die weiteren Schritte unter der Steril-Werkbank. Zunächst wurden noch 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 20 mM Glucose gelöst, bevor das Medium dann zu jeweils 1 mL aliquotiert wurde. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

### TAE-Puffer

Es wurden 40 mM Tris-Acetat und 0,1 mM EDTA in H<sub>2</sub>O bidest. gelöst und der pH-Wert mit 96%iger Essigsäure auf 7,6 eingestellt. Die Lagerung des Puffers erfolgte bei Raumtemperatur.

### Agarosegel (Gel-Elektrophorese)

Um ein 1%iges Agarosegel herzustellen wurde 1 Gew.-% Agarose unter Erhitzen in der Mikrowelle in TAE-Puffer gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C wurde der Lösung Ethidiumbromid (EtBr) hinzugefügt (1 Tropfen/25 mL Lösung). Danach musste die Lösung zügig in die Kammer gegossen werden, wo sie sich beim Erkalten verfestigt hat.

## **3.4.2 Konstruktion der Vektor-Plasmide**

Um die verwendeten Zellen dazu zu bringen, die gewünschten Proteine herzustellen, war es nötig die entsprechende DNA in die Zellen einzubringen. Dies erfolgte im Fall der Zelllinien per transienter Transfektion mit Vektor-Plasmiden. Im Folgenden ist die Herstellung dieser Vektor-Plasmide sowohl schematisch (**Abbildung 3.5**) als auch im Detail beschrieben.



**Abbildung 3.5:** Ablaufschema für die Konstruktion neuer Vektor-Plasmide.

### Klonierung des Inserts in den Vektor

Zum Teil waren die verwendeten Vektoren gebrauchsfertig kommerziell erhältlich. War dies allerdings nicht der Fall musste ein entsprechender Vektor mit molekularbiologischen Methoden hergestellt werden. Die Basis dafür war allerdings wieder ein kommerziell erhältlicher Vektor, in den ein gewünschtes Insert hereinkloniert wurde. Dafür wurden zuerst Insert und Vektor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und dann, entsprechend der Anleitung des Herstellers, mit dem Enzym *Thermo Scientific<sup>TM</sup> FastAP<sup>TM</sup> Thermosensitive Alkaline Phosphatase* am 3'- und am 5'-Ende der geschnittenen DNA dephosphoryliert um die Rezirkulierung des Vektors zu verhindern. Die Trennung und Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Agarose-Gel-Elektrophorese in einem 1%igen Agarosegel mit EtBr-Färbung. Das Gel wurde bei 70 – 80 mV in einer mit TAE-Puffer gefüllten Elektrophorese-Kammer entwickelt. Die gewünschten DNA-Banden konnten dann unter UV-Licht (Geldokumentationssystem Gel IX Imager, Fa. Intas, Göttingen, Deutschland) mit Hilfe eines Größenstandards (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Fa. Thermo Fisher Scientific, Wilna, Litauen) identifiziert und mit einem Skalpell ausgeschnitten werden. Um die DNA aus dem Gel zu extrahieren wurde ein Gelextraktionskit (peqGold Gel Extraction Kit, Fa. Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) entsprechend der Herstelleranleitung verwendet. Dabei wurde das Gel mitsamt der DNA aufgelöst, die DNA dann zur Trennung von den Gelbestandteilen an eine Silika-Membran gebunden und nach einigen Waschschritten mit einem Nidrigsalzpuffer eluiert. Die erhaltenen DNA-Fragmente (Vektor und Insert) konnten nun mit dem Enzym T4-DNA-Ligase verknüpft werden, wobei die Ligase eine Phosphodiesterbrücke zwischen den freien 3'Hydroxy- und den 5'-Enden der beiden Fragmente erzeugte. Nach Herstellerangaben sollte die Ligation in einem Volumen von 10 – 20 µL angesetzt werden und die Vektor-DNA, die Insert-DNA, die T4-DNA-Ligase (5 U/µL), den Ligase-Puffer und H<sub>2</sub>O bidest. enthalten. Ein Religationsansatz wurde ohne Insert angesetzt. Diese Ansätze wurden dann für drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

#### Chemische Transformation in *E. coli*

Nach der Inkubation der Ligationsansätze wurden diese direkt chemisch in den *E. coli*-Stamm XL1-Blue transformiert. Hierfür mussten 50 – 100 µL einer Zellsuspension chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut werden, die dann mit 4 – 10 µL des Ligationsansatzes gemischt und 20 – 30 Minuten auf Eis inkubiert wurden. Danach folgte ein Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42 °C im Thermomixer (Thermomixer 5436, Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und die erneute direkte Kühlung auf Eis. Nach zwei Minuten wurden dem Ansatz 250 – 400 µL, auf 37 °C vorgewärmtes, SOC-Medium hinzugefügt und eine Stunde bei 37 °C mit 300 rpm geschüttelt (Innova 4300 Incubator Shaker, Fa. New Brunswick

Scientific, Edison, USA). Die Zellsuspension wurde danach auf LB-Platten mit Antibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin) ausgestrichen, die dann über Nacht bei 37 °C im Brutschrank (Heraeus Kelvitron T, Fa. Thermo Fisher Scientific, Hanau, Deutschland) kultiviert wurden. Das Antibiotikum wurde so gewählt, dass es der Resistenz im verwendeten Vektor entsprach.

Am Folgetag wurden mit einer Impföse ca. sechs Kolonien von der LB-Platte gepickt und jeweils in 5 – 10 mL LB-Medium, das ebenfalls das entsprechende Antibiotikum enthielt, überführt. Diese Ansätze wurden über Nacht bei 37 °C mit 300 rpm geschüttelt.

#### Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA (Mini)

Zuerst wurden die *E. coli*-Zellen der vorbereiteten Ansätze aus den gepickten Kolonien (s.o.) alkalisch lysiert. Die darauf folgende Isolation kleiner Mengen Plasmid-DNA erfolgte wie in der Anleitung des dafür verwendeten Kits (QIAprep®Spin Miniprep Kit, Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland) beschrieben. Das Wirkungsprinzip des Kits war die Bindung der DNA an eine Kieselgelmembran in Gegenwart hoher chaotroper Salzkonzentrationen und die anschließende Elution mit einem Puffer mit niedriger Salzkonzentration.

#### Überprüfung der Plasmid-DNA und Präparation großer DNA-Mengen

Bevor größere Mengen der Plasmid-DNA hergestellt werden konnten, musste zuerst überprüft werden, ob das Insert korrekt in den Vektor eingebaut wurde. Dafür wurde ein Kontrollverdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen vorgenommen. Gegebenenfalls konnte eine Sequenzierung in Auftrag gegeben werden (durch Fa. GATC Biotech, Konstanz, Deutschland). Konnte ein positiver Klon identifiziert werden, wurde davon eine größere Übernachtskultur (200 mL) hergestellt.

Die Isolation großer DNA-Mengen erfolgte dann erneut nach den Angaben des Herstellers des entsprechenden Extraktionskits (EndoFree® Plasmid Maxi Kit, Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland). Die erhaltene Plasmid-DNA wurde dann in H<sub>2</sub>O bidest. gelöst und die Konzentration der Lösung mit einem Photometer bestimmt (NanoPhotometer, Fa. Implen, München, Deutschland). Gegebenenfalls konnte die Konzentration der Plasmid-DNA durch weitere Zugabe von H<sub>2</sub>O bidest. noch auf einen bestimmten Wert eingestellt werden (z. B.: 1 µg/µL).

### 3.4.3 Vektor-Plasmide

Die folgenden Vektoren wurden für die Transfektion in MIN6-Zellen oder für die Virenproduktion in AD293-Zellen produziert und verwendet.

#### Plasmid-Vektoren für die Transfektion in MIN6

- pEGFP-N1/hIns-EGFP
- pEGFP-N1/hIns-tDimer
- pAdlox/mIns-C-emGFP
- pAdlox/mIns-C-mCherry
- pGW1/PercevalHR

#### Plasmid-Vektoren für die Virenproduktion in AD293-Zellen

- pShuttle-CMV/hIns-EGFP
- pShuttle/CMV-mIns-C-emGFP
- pShuttle-CMV-Linker/PercevalHR
- pShuttle-CMV-Linker/mTagRFP-T-Lifeact7

Die Herstellung der hier aufgeführten Vektor-Plasmide erfolgte unter Anwendung der vorher aufgeführten molekularbiologischen Methoden. Im Folgenden ist daher jeweils nur eine kurze Beschreibung der verwendeten Enzyme und Primer dargestellt.



pEGFP-N1/hIns-EGFP

Die cDNA des humanen Preproinsulin (hIns) wurde mit der PCR-Methode amplifiziert, dabei wurden über die verwendeten Primer Schnittstellen für *XhoI* und *BamHI* an den Enden des PCR-Produktes erzeugt. Das amplifizierte Insert und der pEGFP-N1-Vektor wurden mit *BamHI* und *XhoI* geschnitten und das Insert in die MCS (*multiple cloning site*) des Vektors ligiert. Der dabei entstandene Plasmid-Vektor trägt die DNA-Sequenz für das Fusionsprotein hIns-EGFP, wobei hIns und EGFP durch einen Linker aus acht Aminosäuren (GDPPVATM) verbunden sind.

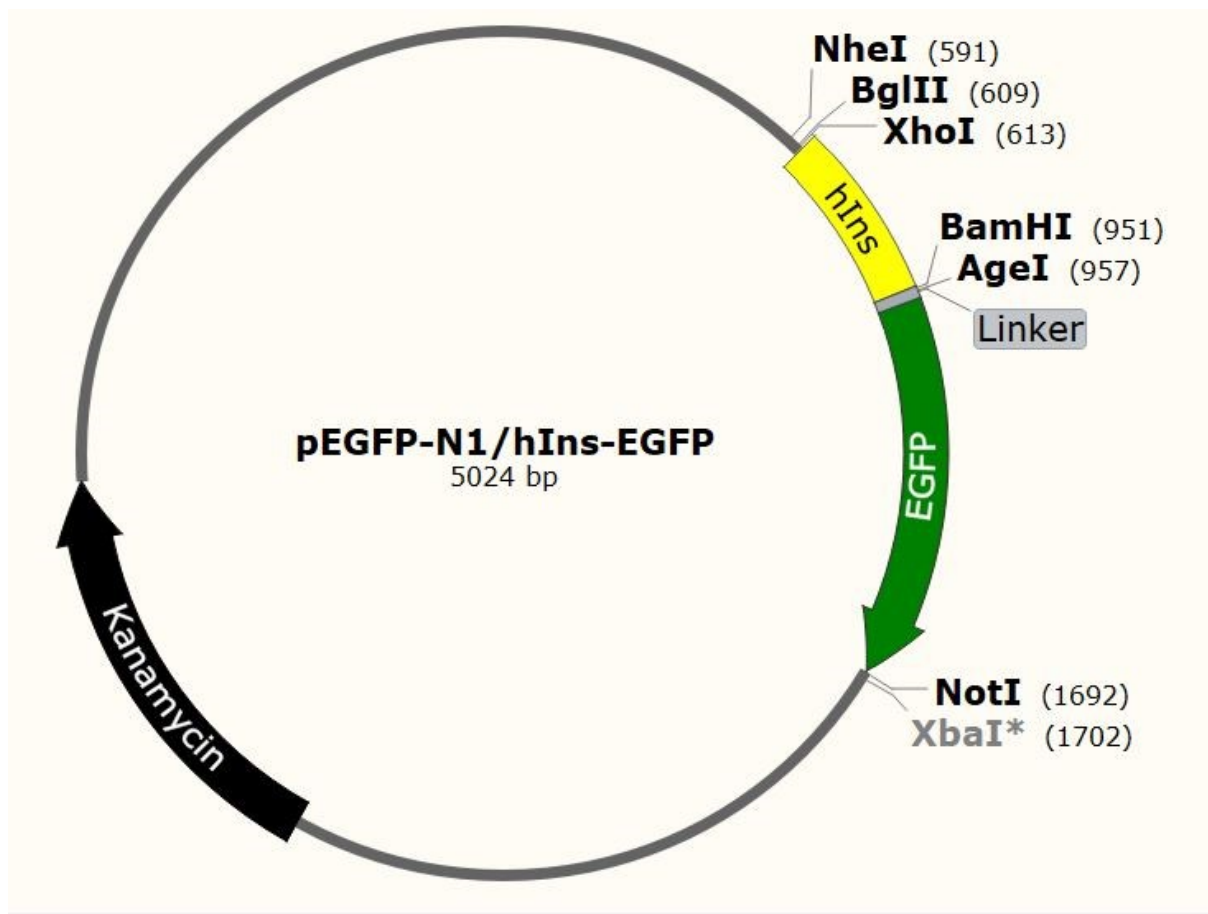


Abbildung 3.6: Plasmidkarte von pEGFP-N1 / hIns-EGFP

pEGFP-N1/hIns-tDimer

Die cDNA von tDimer wurde mit der PCR-Methode amplifiziert, dabei wurden über die verwendeten Primer Schnittstellen für *AgeI* und *NotI* an den Enden des PCR-Produktes erzeugt. Das amplifizierte Insert und der Vektor pEGFP-N1/hIns-EGFP wurden mit *AgeI* und *NotI* geschnitten, wobei das EGFP aus dem Vektor herausgeschnitten wurde. Das tDimer wurde im Anschluss in den Vektor ligiert, wo es das herausgeschnittene EGFP ersetzte.

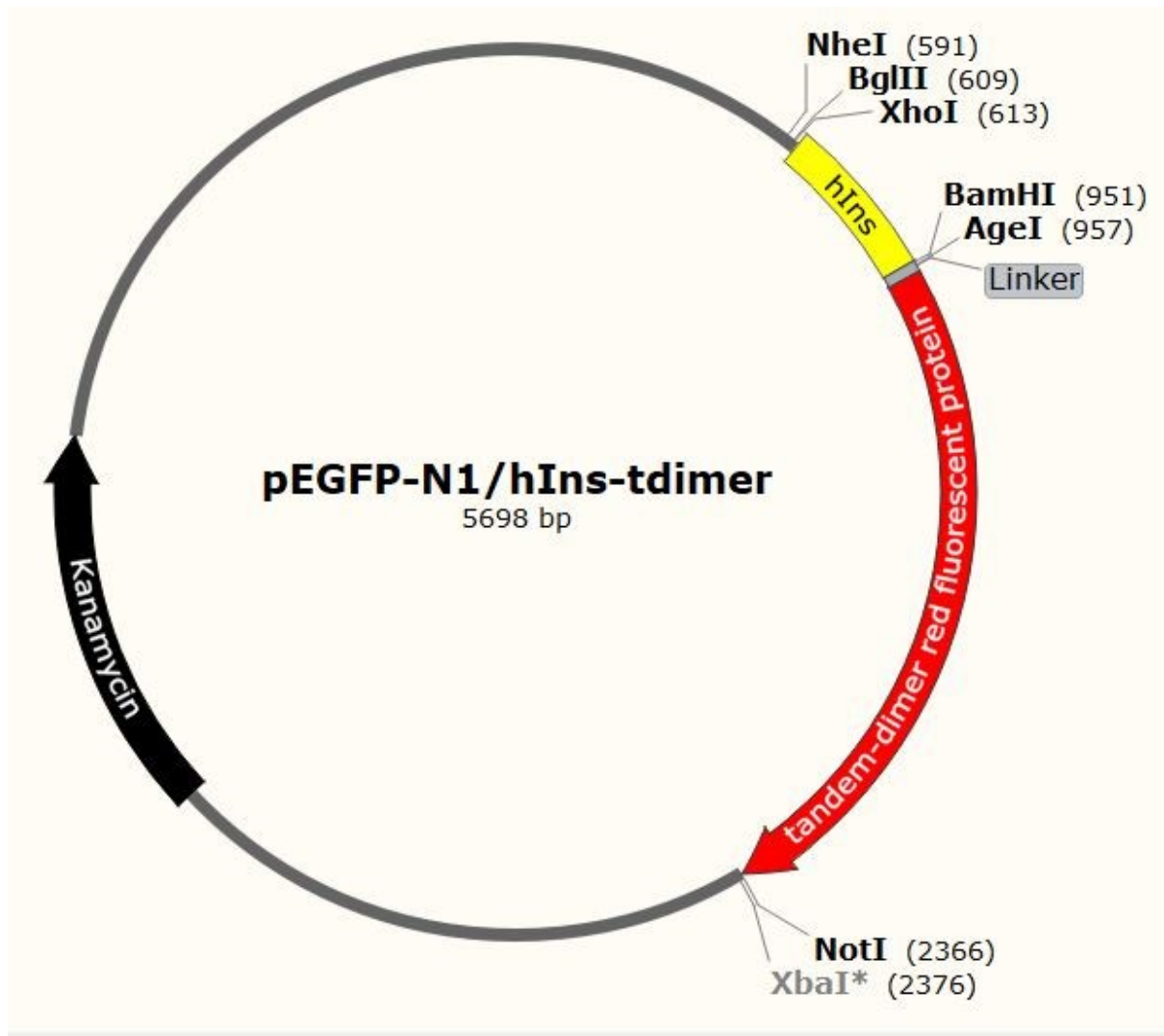


Abbildung 3.7: Plasmidkarte von pEGFP-N1 / hIns-tDimer

pAdlox/mIns-C-emGFP

Dieser Vektor wurde fertig von PETER DRAIN bezogen und direkt für die transiente Transfektion verwendet (176).

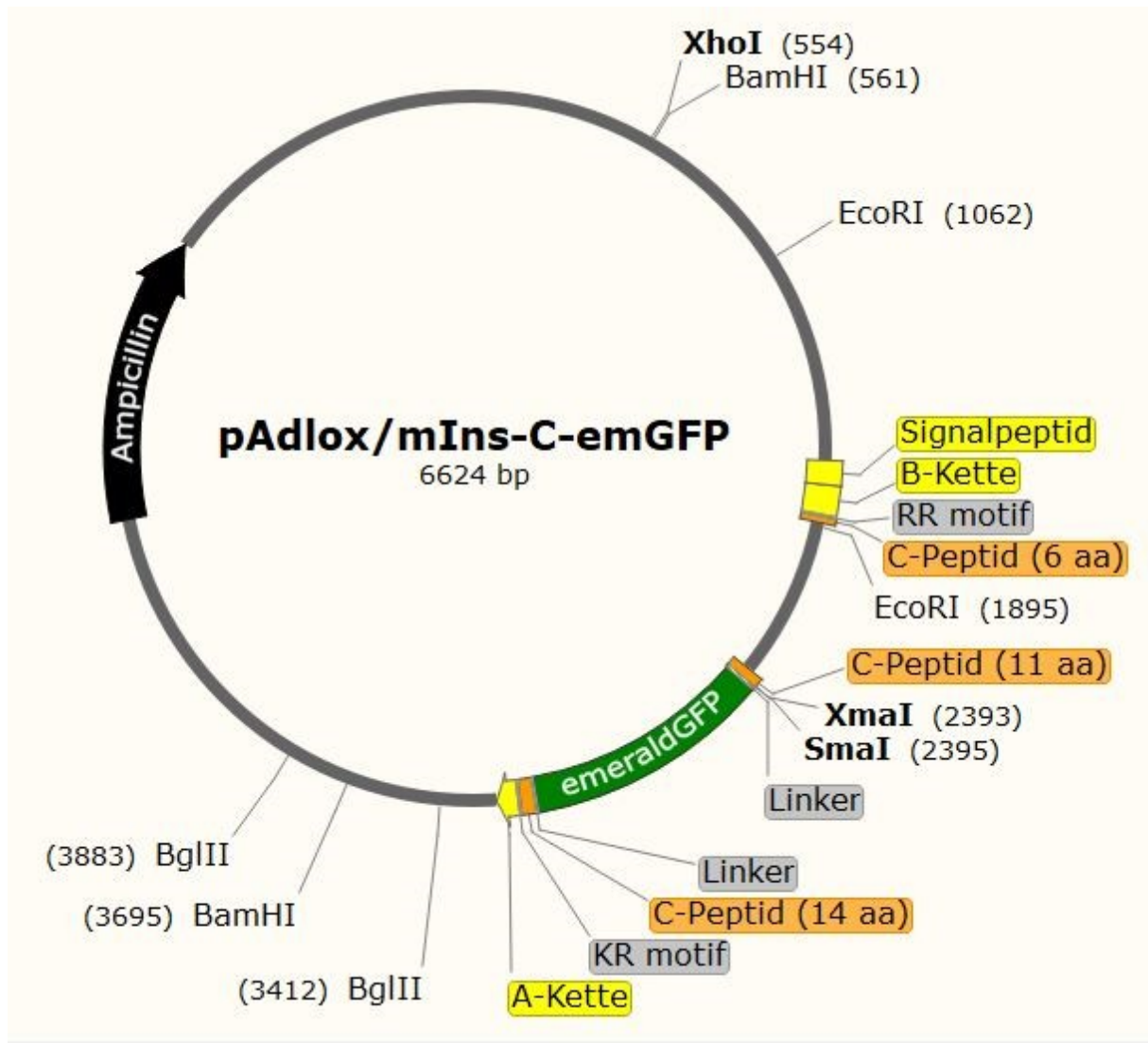


Abbildung 3.8: Plasmidkarte von pAdlox / mIns-C-emGFP

pAdlox/mIns-C-mCherry

Dieser Vektor wurde fertig von PETER DRAIN bezogen und direkt für die transiente Transfektion verwendet.

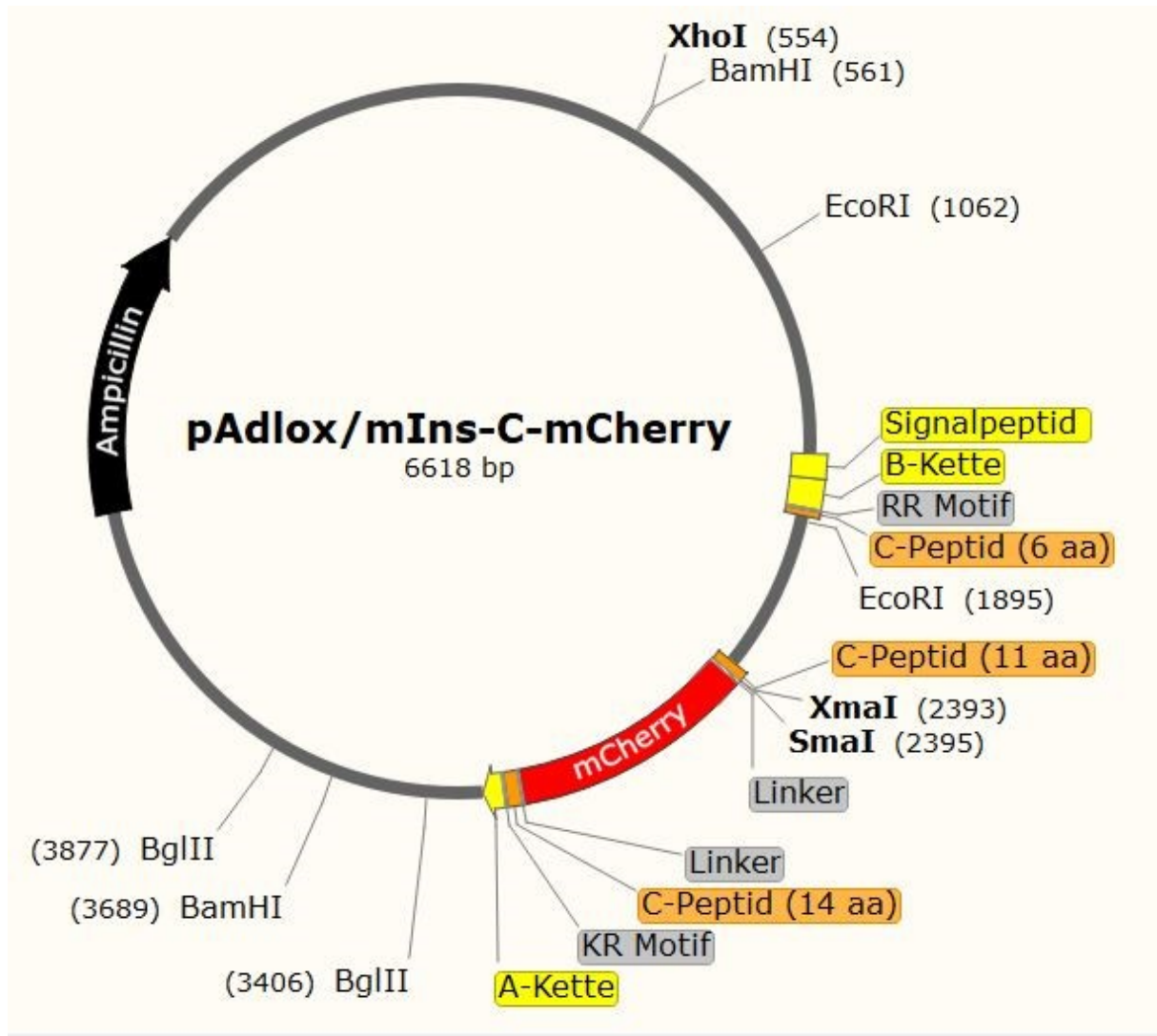


Abbildung 3.9: Plasmidkarte von pAdlox / mIns-C-mCherry

### pGW1/PercevalHR

Dieser Vektor wurde fertig von Addgene bezogen und direkt für die transiente Transfektion verwendet.

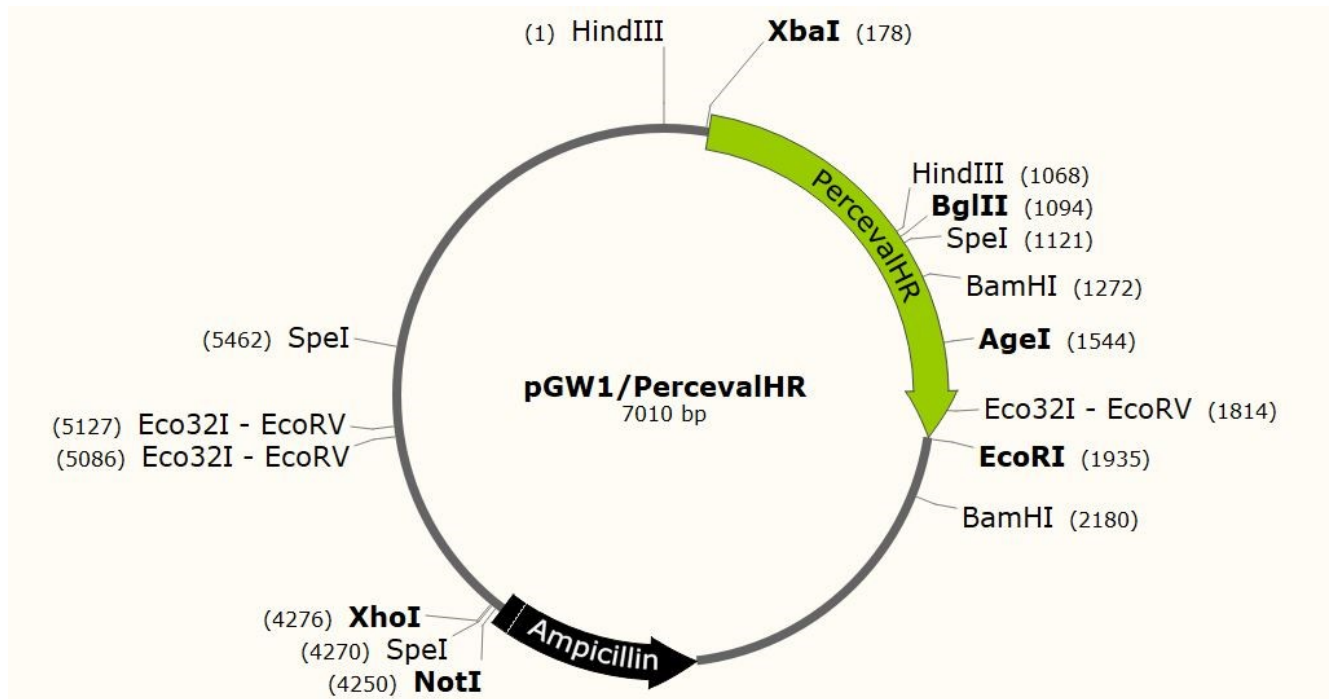


Abbildung 3.10: Plasmidkarte von GW1 / PercevalHR

pShuttle-CMV/hIns-EGFP

Das Insert hIns-EGFP wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme *NotI* und *BglII* in den kommerziell erhältlichen Vektor pShuttle-CMV kloniert.

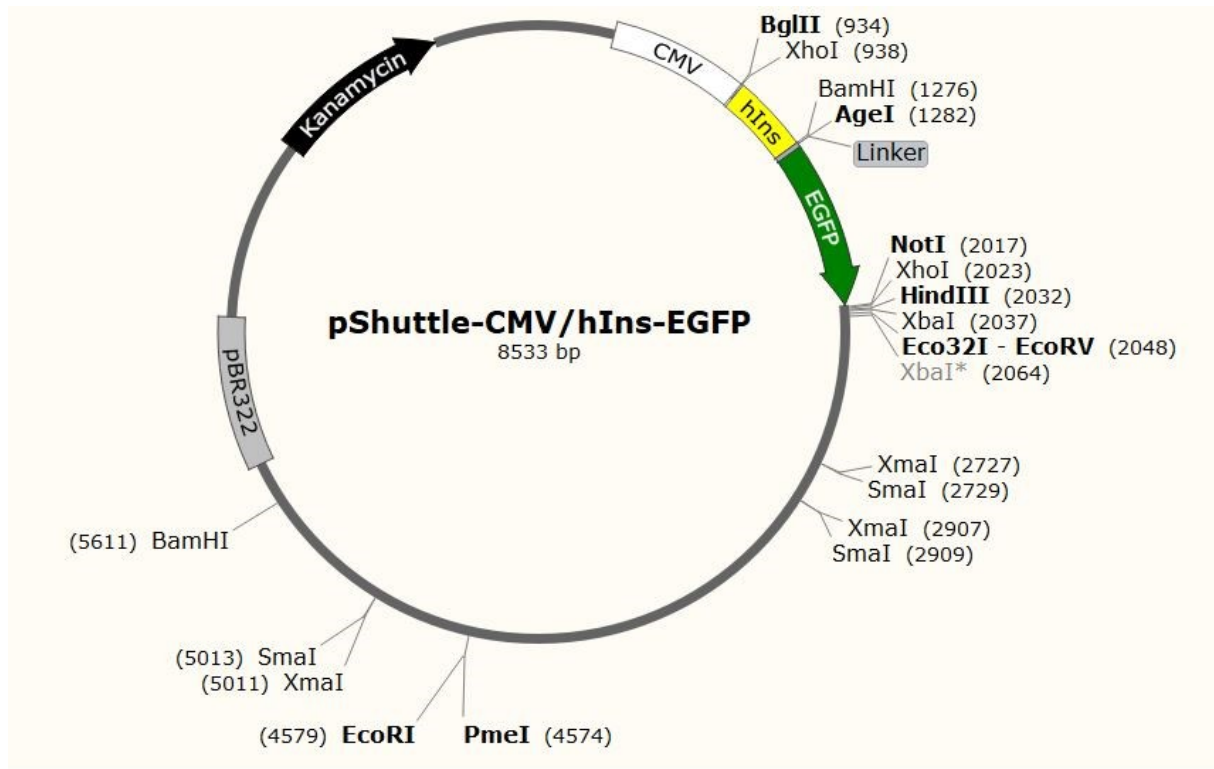


Abbildung 3.11: Plasmidkarte von pShuttle-CMV / hIns-EGFP

pShuttle/CMV-mIns-C-emGFP

Das Insert mIns-C-emGFP wurde mit den Restriktionsenzymen *NotI*-HF und *SpeI* ausgeschnitten und der Vektor pShuttle mit den Enzymen *NotI*-HF und *XbaI* geöffnet. Anschließend wurde das Insert in den Vektor ligiert.

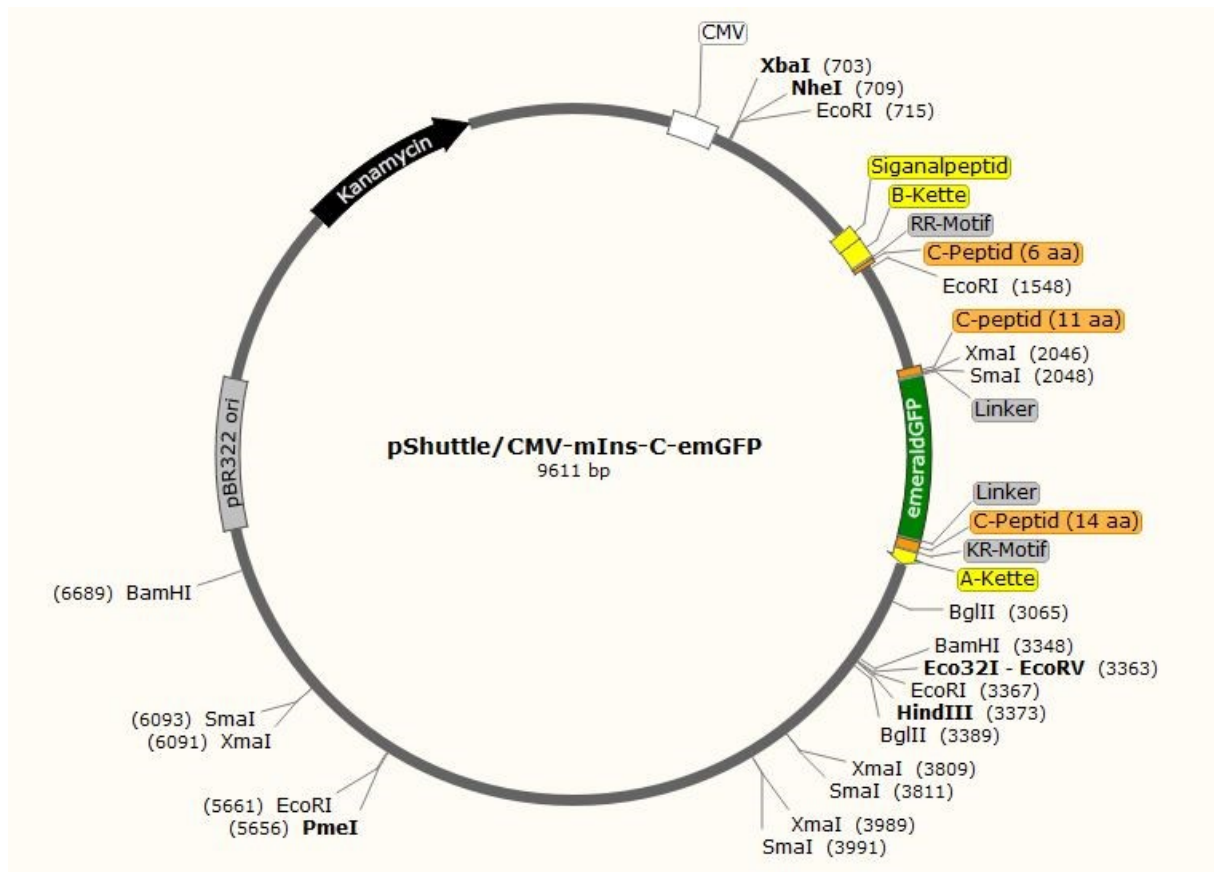


Abbildung 3.12: Plasmidkarte von pShuttle / CMV-mIns-C-emGFP



pShuttle-CMV-Linker/PercevalHR

Das Insert PercevalHR wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XbaI* ausgeschnitten. Dabei entstanden überstehende Enden („sticky ends“) an den beiden Seiten der ausgeschnittenen DNA, die dann mit dem Klenow-Enzym aufgefüllt wurden, sodass gerade Enden entstanden („blunt ends“). Der Vektor pShuttle-CMV-Linker wurde mit dem Restriktionsenzym *Eco321* geöffnet und das Insert in den Vektor ligiert.

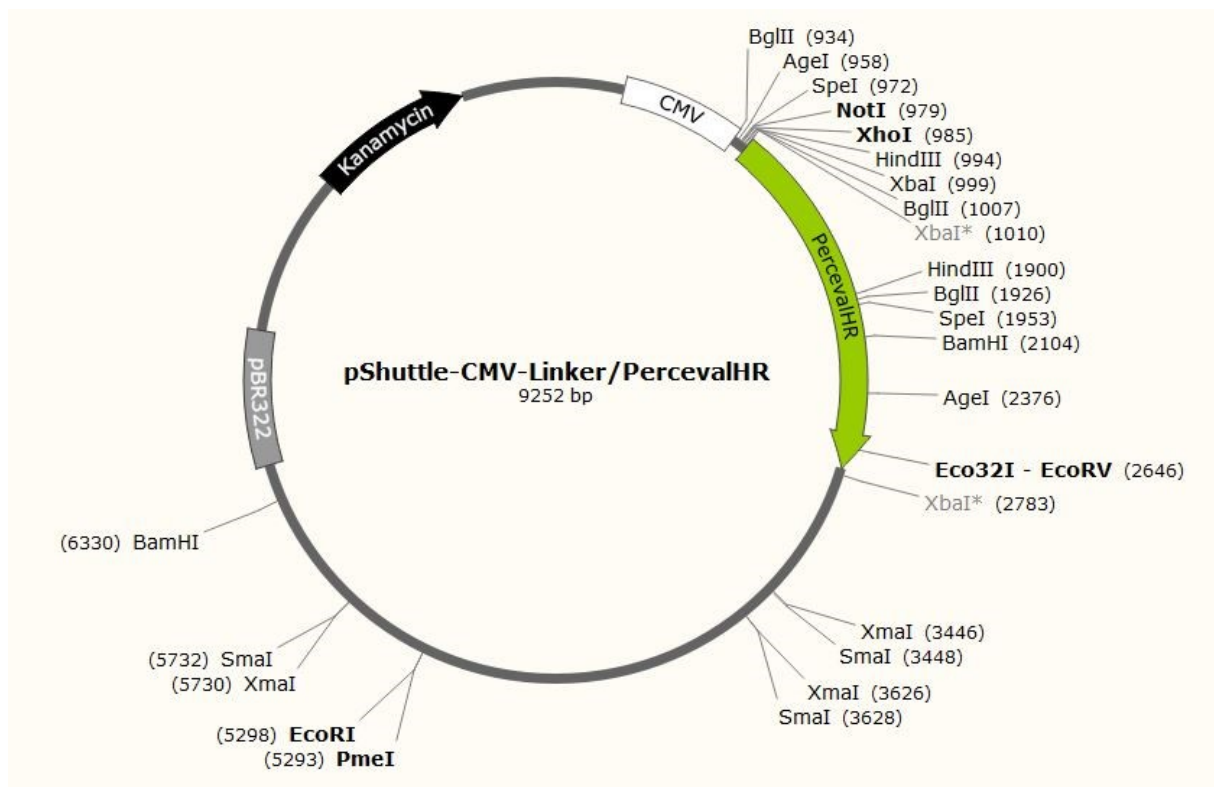


Abbildung 3.13: Plasmidkarte von pShuttle-CMV-Linker / PercevalHR



pShuttle-CMV-Linker/mTagRFP-T-Lifeact7

Das Insert mTagRFP-T-Lifeact7 wurde mit *NheI*-HF und *NotI*-HF ausgeschnitten und der Vektor pShuttle-CMV-Linker mit *SpeI*-HF und *NotI*-HF geöffnet. Anschließend wurde das Insert in den Vektor ligiert.

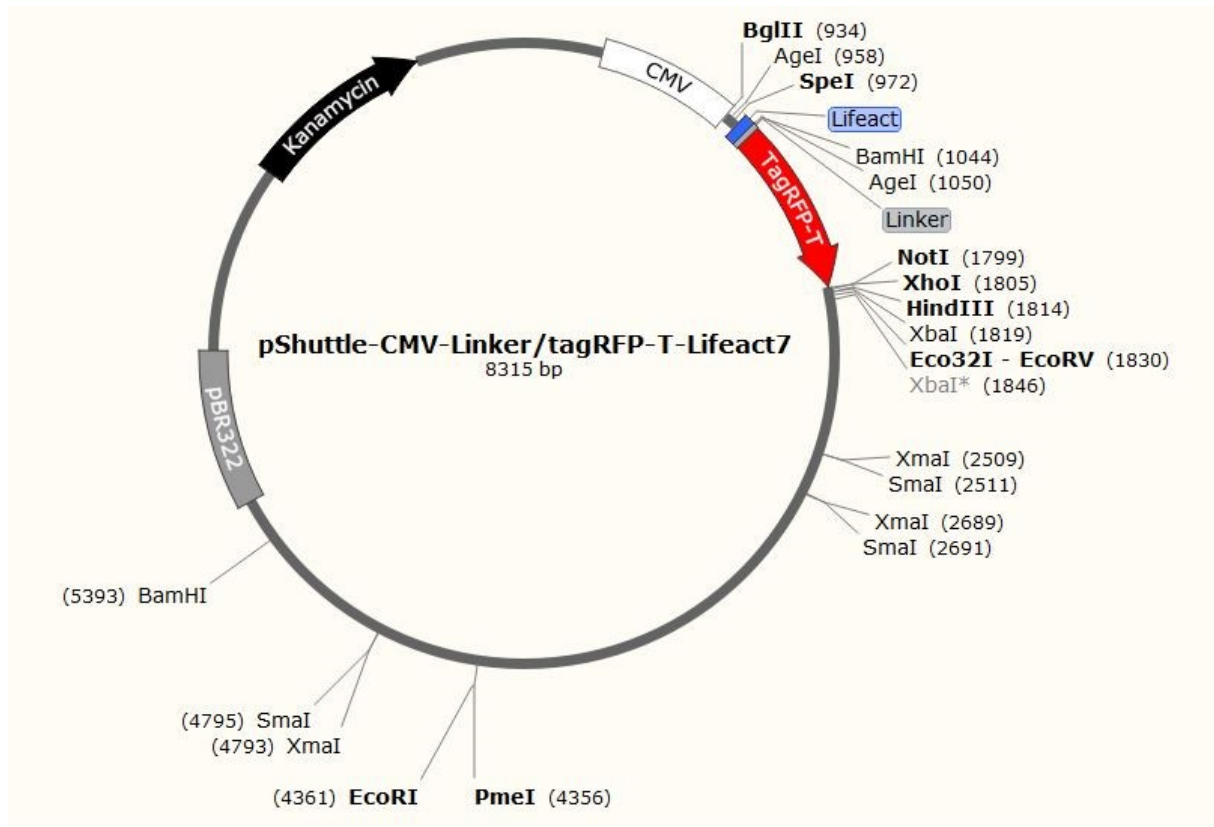


Abbildung 3.14: Plasmidkarte von pShuttle-CMV-Linker / tagRFP-T-Lifeact7

#### **3.4.4 Transiente Transfektion von MIN6-Zellen**

Vor der Transfektion wurde eine 6-Well-Platte mit Deckgläschen versehen, auf denen die transfizierten Zellen für spätere fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen anwachsen konnten.

Die transiente Transfektion erfolgte mit Lipofectamin 2000. Dieses besteht aus kationischen und neutralen Lipiden, die sowohl mit der negativ geladenen DNA komplexierten als auch ein Lipid-Vesikel um diesen Komplex bildeten, der von der Zelle endozytotisch aufgenommen wurde. In der Zelle wurde die DNA wieder freigesetzt.

Für die Transfektion wurden pro Ansatz 0,2 µg DNA mit OptiMem zu einem Gesamtvolumen von 25 µL gemischt. Parallel wurden pro Ansatz 0,5 µL Lipofectamin 2000 mit OptiMem zu einem Gesamtvolumen von ebenfalls 25 µL gemischt, wobei es sich empfahl einen Ansatz mehr herzustellen. Beides wurde für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde dem DNA-Ansatz die gleiche Menge des Lipofectamin-Ansatzes hinzugefügt und das Gemisch wurde 20 – 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit konnten die Zellen für die Transfektion vorbereitet werden. Dabei wurden die Zellen aus einer Zellkulturflasche mit PBS gewaschen und mit Trypsin abgelöst (siehe: Kapitel 3.3.7). Nach dem Beenden des Verdaus und der Zentrifugation der Zellen wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet mit OptiMem resuspendiert. Als Nächstes wurde die Anzahl der Zellen bestimmt (siehe: Kapitel 3.3.6) und die Zellsuspension daraufhin so verdünnt, dass pro Ansatz eine Zellsuspension mit 50000 Zellen in 50 µL OptiMem erhalten wurde. Die Zellsuspension konnte nach Ablauf der Inkubation zum DNA-Lipofectamin-Gemisch pipettiert werden. Von diesem Ansatz, der nun aus DNA, Lipofectamin 2000 und den Zellen bestand, wurden 100 µL jeweils mittig auf ein Deckgläschen in der 6-Well-platte gesetzt, die dann drei Stunden im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert wurde. Zuletzt musste jedem Well noch 3 mL DMEM (mit 10 % FCS) hinzugefügt werden. Die Experimente mit diesen Zellen konnten nach 48 – 96 Stunden durchgeführt werden.

#### **3.4.5 Adenovirale Transduktion**

Die adenoviralen Transduktionen wurden nach Herstellerangaben mit dem AdEasy<sup>TM</sup> XL Adenoviral Vector System (Fa. Agilant Technologies, La Jolla, USA) durchgeführt. Dieses enthielt unter anderem die bereits vorgestellten AD293-Zellen und die für die Virenproduktion verwendeten Shuttle-Vektoren (siehe: Kapitel 3.4.3). In diesem Vektor-System wurden

humane Adenoviren des Serotyps 5 verwendet, bei denen die Bereiche E1 und E3 aus dem Genom deletiert wurden. Das E1 Gen ist essenziell für die Zusammenlagerung infektiöser Viruspartikel und war ergänzend im Genom der Verpackungszelllinie (AD293) vorhanden. Das E3 Gen beinhaltet Proteine, deren Zweck es ist die Immunabwehr des Wirts zu umgehen und war für unsere Anwendung entbehrlich. Durch die Deletion beider Gene war viel Platz im Virusgenom, der mit gewünschten Genen besetzt werden konnte.

#### **3.4.5.1 Konstruktion adenoviraler Vektoren und Virenproduktion**

Wie die **Abbildung 3.15** zeigt handelte es sich bei der Konstruktion der adenoviralen Vektoren und der anschließenden Virenproduktion um einen mehrstufigen Prozess. Dieser begann mit der Klonierung der gewünschten Gene in einen Shuttle-Vektor (siehe: Kapitel **3.4.3**), mit dem, per Elektroporation, BJ5183-AD-1 Zellen transformiert wurden. Bei den BJ5183-AD-1 Zellen handelte es sich um Zellen des *E. coli*-Stammes BJ5183, die mit dem Plasmid pAdEasy-1 transformiert wurden. Homologe Rekombination erzeugte dann DNA, die die viralen Gene und die des Shuttle-Vektors enthielt. Die dabei gewonnene DNA wurde im nächsten Schritt linearisiert und in AD293-Zellen transfiziert. In dieser Zelllinie konnten sich Viruspartikel bilden und vermehren, die im Anschluss geerntet wurden. Die geernteten Viren wurden bei - 80 °C gelagert und konnten zur weiteren Vermehrung oder für eine virale Transduktion (ab Viruspassage zwei oder drei) verwendet werden.

##### Klonierung des Inserts in den Shuttle-Vektor

Die Klonierung des Inserts in den Shuttle-Vektor erfolgte zunächst wie in Kapitel **3.4.3** beschrieben. Daran schloss sich die Linearisierung des Vektors über Nacht mit dem Restriktionsenzym *PmeI* an, die nach Angaben des Herstellers durchgeführt wurde. Die linearisierte DNA wurde dann mit dem Enzym *Thermo Scientific™ FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase* dephosphoryliert um eine erneute Zyklisierung zu verhindern. Dann erfolgte die Aufreinigung nach Herstellerangaben mit dem Gel-Extraktions-Kit (peq Gold Gel Extraction Kit, Fa. Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland).



**Abbildung 3.15:** Ablaufschema für die Produktion neuer Adenoviren

#### Transformation und homologe Rekombination in BJ5183-AD-1

Die Transformation erfolgte mittels Elektroporation. Hierfür wurden die BJ5183-AD-1 Zellen und die vorher linearisierte DNA auf Eis aufgetaut und 100 ng DNA mit 40 µL Zellsuspension vermengt und dann alles in eine Küvette für die Elektroporation (Fa. Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland) überführt. Diese wurde dann im Elektroporator (Eppendorf Elektroporator 2510, Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gepulst (2000 Ω, 2,5 kV, 25 µF). Dem Ansatz wurden 500 µL warmes, steriles SOC-Medium hinzugefügt, alles zusammen in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und darin für 30 Minuten bei 37 °C mit 300 rpm geschüttelt. Anschließend wurde der Ansatz auf einer LB-Platte mit Kanamycin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

### Plasmid-Präparation

Am Folgetag wurden von der Platte bis zu acht Klone isoliert, mit denen jeweils 10 mL LB-Medium (mit Kanamycin) angeimpft wurden, welche dann über Nacht bei 37 °C mit 300 rpm geschüttelt wurden. Die Isolierung der DNA aus diesen Ansätzen erfolgte entsprechend der Anleitung des Herstellers mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit (Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland). Mit den isolierten Plasmiden wurde wie vom Hersteller angegeben ein Kontrollverdau mit *PacI* durchgeführt. Die verdaute DNA wurde mit Hilfe eines mit EtBr beladenen Agarosegels, das eine Stunde bei 70 – 80 V entwickelt wurde, untersucht. Die Detektion fand unter UV-Licht mit Hilfe eines Größenstandards statt.

### Retransformation in XL10-Gold

Die DNA eines positiv getesteten Klons wurde im Folgeschritt per Hitzeschock (siehe: Kapitel 3.4.2 - Chemische Transformation in *E. coli*) in den chemisch kompetenten *E. coli*-Stamm XL10-Gold transformiert und dieser über Nacht in einem großen Ansatz von 200 mL vermehrt (37 °C, 300 rpm). Die Isolierung der DNA aus der Übernachtskultur erfolgte mit einem Kit (EndoFree Plasmid Maxi Kit, Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland). Vor der Transfektion in die AD293-Zellen wurde die DNA dann erneut linearisiert (*PacI*) und mit einem Gel-Extraktions-Kit (peq Gold Gel Extraction Kit, Fa. Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) gereinigt. Die Konzentrationsbestimmung und -einstellung der wässrigen DNA-Lösung erfolgte wie zuvor beschrieben (siehe: Kapitel 3.4.2 - Überprüfung der Plasmid-DNA und Präparation großer DNA Mengen).

### Transfektion der AD293-Zellen

Die Produktion der Viren in den AD293-Zellen fand in einer 6-Well-Platte statt. Am Vortag der Transfektion wurden je Well  $5 \cdot 10^5$  Zellen in DMEM (ohne Antibiotikum) ausgesät. Die Schritte vom Ablösen der Zellen von der Zellkulturflasche bis hin zur Resuspendierung des Zellpellets nach dem Zentrifugieren wurden analog zum Kapitel 3.3.7 und die Bestimmung der Zellzahl wie in Kapitel 3.3.6 durchgeführt. Dann wurde die entsprechende Menge Zellen pro Well mit jeweils 3 mL Medium ausgesät.

Für die Transfektion wurden dann je Well 2 µg linearisierte DNA in 250 µL OptiMem und 250 µL Lipofectamin 2000 in OptiMem (6,2 µL Lipofectamin 2000 + 243,8 µL OptiMem) hergestellt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lipofectamin wurde dann zur DNA hinzugefügt und weitere 20 – 30 Minuten inkubiert. Die am Vortag vorbereiteten Zellen konnten in dieser Zeit vorbereitet werden, indem das Medium entfernt und die Zellen

einmal mit PBS gewaschen wurden. Danach wurde der Transfektionsansatz (DNA + Lipofectamin 2000) auf die Zellen gegeben, die daraufhin eine Stunde im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert wurden. Anschließend wurde den Zellen pro Well 2 mL DMEM hinzugefügt.

#### Virenernte

Die vorher transfizierten AD293-Zellen mussten in den Folgetagen optisch kontrolliert werden, da die Virenernte erst dann erfolgen konnte, wenn sich einerseits genug Viruspartikel gebildet hatten diese aber andererseits auch noch aktiv waren um erneut Zellen zu infizieren. Dies war der Fall, wenn sich gerade der Großteil der AD293-Zellen vom Boden der 6-Well-Platte abgelöst hatte.

Bei der Virenernte wurden dann zunächst alle Zellen mit einer Pipette vollständig abgelöst und die entstandene Zellsuspension in ein 50 mL Zentrifugen-Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde danach zuerst zentrifugiert (10 min, 2500 g, 4°C), der Überstand entfernt, das Pellet in 3 mL kaltem PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert (8 min, 2500 g, 4°C). Der Überstand wurde wieder entfernt und das Pellet in 0,5 mL kaltem PBS pro  $5 \cdot 10^5$  Zellen aufgenommen. Die entstandene Zellsuspension wurde zu je 1 mL in Kryoröhrchen überführt, in denen der Zellaufschluss erfolgte. Hierfür mussten die Zellen zunächst fünf Minuten in flüssigem Stickstoff gekühlt und dann fünf Minuten im Wasserbad bei 37 °C erwärmt werden. Dieser Vorgang wurde insgesamt drei Mal durchgeführt. Dann wurden mittels Zentrifugation (10 min, 31000 g, 4°C) die freigesetzten Viren von den Zelltrümmern, die beim Aufschluss entstanden, getrennt. Der Überstand, der die viralen Partikel enthielt, konnte dann zu je 450 µL aliquotiert und bis zur späteren Verwendung bei -80 °C gelagert werden.

#### Vermehrung der Viren

Für die Vermehrung von Viren wurden zunächst  $4 \cdot 10^6$  AD293-Zellen in Zellkulturplatten (Cell+ mit Nocken) mit einem Radius von 10 cm ausgesät und über Nacht kultiviert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).

Am nächsten Tag wurden pro Platte 200 µL aufgetaute Viren mit 4,8 mL DMEM in einem 50 mL Röhrchen mit dem Vortex gemischt. Dann wurde das Medium von den am Vortag vorbereiteten Zellen abgenommen und die Zellen mit 10 mL PBS gewaschen. Nun konnte das Virengemisch auf die Zellen gegeben werden. Direkt im Anschluss wurden den Platten noch 5 mL DMEM hinzugefügt und die Zellen wurden bis zur Virenernte (s.o.) im Brutschrank (37 °C, 5 %CO<sub>2</sub>) inkubiert. Bei jeder Virenvermehrung stieg die Passage der Viren um eins.

### 3.4.5.2 Transduktion der primären Beta-Zellen

Für die Transduktion der primären Beta-Zellen wurden die Zellen am Vortag isoliert und auf Deckgläschen kultiviert (siehe: Kapitel 3.2.4). Für die Transduktion wurden zunächst pro Deckgläschen 100 µL eines entsprechenden Virengemisches auf Eis aufgetaut. Dabei wurde ein Aliquot mit 450 µL für vier Deckgläschen verwendet. Von dem Virengemisch wurden jeweils 100 µL in 400 µL RPMI, das 5 mM Glucose enthielt, pipettiert und mit dem Vortex gemischt. Dann wurde das Medium von den kultivierten Einzelzellen entfernt und die 500 µL Viruslösung in RPMI langsam auf die Zellen getropft. Danach erfolgte sofort die Zugabe von 2,5 mL RPMI (5 mM Glucose) pro Deckgläschen und die Inkubation im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Nach 24 Stunden wurde das Medium mit den Viren entfernt, die Zellen drei Mal mit 3 mL 37 °C warmem PBS gewaschen um die Viren vollständig zu entfernen und jeweils 3 mL neues RPMI-Medium (5 mM Glucose) auf die Zellen gegeben. Dann konnten die Zellen bis zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung nach weiteren 24 – 48 Stunden im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) kultiviert werden.

#### Alternativer Ansatz

Alternativ konnten die einzelnen Beta-Zellen auch direkt am Tag der Isolierung transduziert werden. Dabei lief zunächst alles wie vorher beschrieben, bis die Zellen für drei Stunden zum Anwachsen an das Deckgläschen in den Brutschrank gestellt wurden. Nach dem Anwachsen wurde statt des normalen RPMI-Mediums in jedes Well 3 mL RPMI mit jeweils 100 µL Virengemisch gegeben, die vorher mit dem Vortex gemischt wurden. Erst nach 48 Stunden wurden die Zellen dann wie zuvor beschrieben von den restlichen Viren befreit (3 x 3 mL PBS) und nach weiteren 24 – 48 Stunden fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Zwischenzeitlich wurden die Zellen immer in 3 mL RPMI (5 mM Glucose) im Brutschrank inkubiert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).

Bei dieser Alternativen Methode wurden beim Prozess der Transduktion weniger Zellen vom Deckgläschen gespült, besonders wenn zusätzlich Beschichtungen verwendet wurden um die Einzelzellen am Deckgläschen anhaften zu lassen. Außerdem war die durchschnittliche Fluoreszenzintensität in den Zellen während der Messungen höher, da die Viren fast doppelt so lange auf die Zellen einwirken konnten.

### 3.5 Fluoreszenzmikroskopische Methoden

Alle fluoreszenzmikroskopischen Experimente (sowohl Epifluoreszenz als auch TIRF) wurden mit dem iMIC-Fluoreszenzmikroskop (Fa. Till Photonics, Gräfeling, Deutschland) durchgeführt. Die verwendete Lichtquelle für die Anregung der Epifluoreszenz war der Polychrom V (Fa. Till Photonics, Gräfeling, Deutschland). Für die TIRF-Anregung standen drei DPSS-Laser (diode pumped solid state) der Wellenlängen 491 nm (100 mW), 561 nm (75 mW) (Cobolt, Stockholm, Schweden) und 640 nm (140 mW) (Topica Photonics, Gräfeling, Deutschland) zur Verfügung. Für Calciummessungen wurde ein spezielles Fura-Filterset verwendet, während für alle anderen Messungen ein Quad-Filterset verwendet wurde, das für vier Anregungs- ( $405\pm 10$  nm,  $488\pm 10$  nm,  $561\pm 10$  nm,  $640\pm 10$  nm) und dem entsprechend auch vier Emissionswellenlängen ( $440\pm 20$  nm,  $520\pm 20$  nm,  $600\pm 20$  nm,  $680\pm 20$  nm) durchlässig war. Während der TIRF-Experimente musste ein Wechsel des Filters vermieden werden, da das zu einem Fokusverlust des TIRF-Bildes geführt hätte. Für die simultane Betrachtung zweier Wellenlängen wurde ein Dichotom (Fa. Till Photonics, Gräfeling, Deutschland) verwendet. Dieses war in der Lage das Fluoreszenzlicht mit einem Strahlenteiler zu trennen, da dieser für Licht bis zu einer Wellenlänge von 560 nm durchlässig war und Licht höherer Wellenlängen spiegelte. So konnten zwei Emissionswellenlängen getrennt und parallel auf jeweils eine Hälfte eines Kamerachips projiziert werden. Für die Detektion des Fluoreszenzlichtes wurde eine gekühlte 12-Bit CCD-Kamera (sensicam qe, Fa. PCO, Kelheim, Deutschland) mit einer Pixelgröße von  $6,45 \times 6,45 \mu\text{m}$  verwendet. Alle Epifluoreszenz-Messungen wurden mit einem Zeiss Fluar Objektiv (40x, 1,3 N.A.) durchgeführt. Für die TIRF-Experimente musste ein Zeiss  $\alpha$ -Plan-Fluar Objektiv (100x, 1,45 N.A.) verwendet werden, da dieses eine entsprechend hohe Numerische Apertur aufwies um das Anregungsglicht, das durch das Objektiv auf die Probe geleitet wurde, in einem hinreichend flachen Winkel von  $68^\circ$  auf die Probe treffen zu lassen. Durch diesen flachen Einstrahlwinkel kam es zur totalen Reflexion des Anregungslichtes und es konnte sich eine evaneszente Welle ausbilden, welche die Fluorophore in den ersten ca. 200 nm der Zelle zur Fluoreszenz anregen konnte. Zur Temperierung der Experimente war das Mikroskop von einer Plexiglaskammer umgeben. Diese war mit schwarzem Stoff abgedunkelt und wurde mit einer Heizung mit Temperaturfühler auf eine vorher eingestellte Temperatur gebracht (Solent Scientific, Portsmouth, UK). Da es etwas länger dauerte die eingegebene Temperatur stabil zu halten wurde die Kammer bereits am Vorabend der Experimente vorgeheizt, da Temperaturschwankungen zu Problemen bei der Fokussierung der Bildebene im TIRF-Modus geführt hätten. Die Bedienung des Mikroskops erfolgte über den Computer mit dem Programm LiveAquisition 2.4.0.17 (Till Photonics,



Gräfeling, Deutschland). Die Kommunikation des Computers mit dem Mikroskop und den anderen Bestandteilen lief über die ICU (Imaging Control Unit), die SPU (Scanning Power Unit) und die SCU (Scanning Control Unit) ab.

### 3.5.1 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung erfolgte für alle Experimente auf die gleiche Weise. Es wurden jeweils auf Deckgläschen festgewachsene Zellen verwendet. Wenn ein Farbstoff verwendet wurde, mit dem die Zellen beladen wurden, konnten Zellen verwendet werden, die 24 Stunden (oder länger) vorher kultiviert wurden (siehe: Kapitel 3.2.4). Transduzierte (siehe: Kapitel 3.4.5.1) oder transfizierte (siehe: Kapitel 3.4.4) Zellen wurden vorher wie in den entsprechenden Kapiteln beschrieben vorbereitet.

In jedem Fall wurden die entsprechenden Zellen aus dem Brutschrank genommen und in einer Petrischale (Durchmesser: 3,5 cm) drei Mal mit frisch hergestellter Krebs-Ringer Lösung gewaschen. Wenn die Zellen noch beladen werden mussten wurde das im nächsten Schritt getan. Dafür wurden die Zellen für 20 Minuten mit dem entsprechenden Farbstoff inkubiert und anschließend noch drei Mal mit Krebs-Ringer Lösung gewaschen. Dann wurden die Zellen direkt in eine speziell für die Umströmung entworfene Kammer eingebaut (**Abbildung 3.16**) und diese an die Schläuche für die kontinuierliche Umströmung angeschlossen.



**Abbildung 3.16:** Umströmungskammer für die TIRF-Mikroskopie

### 3.5.2 Umströmung der Proben und verwendete Lösungen

Die in der Kammer vorbereiteten Zellen wurden konstant mit frischen Krebs-Ringer Medium umströmt. Diese wurde in zwei angeschlossenen Reservoirs temperiert und mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) begast. Mit einem Dreiwege-Ventil war es möglich zwischen den Reservoirs zu wechseln, dabei war darauf zu achten, dass während des Wechsels keine Luft in das System gelangt. Die für die Perfusion verwendete Pumpe (Perfusor V, B. Braun, Melsungen, Deutschland) wurde hinter der Kammer angeschlossen um das Medium durch das System zu ziehen. Die Pumpe musste während der Umstellung auf ein anderes Reservoir nicht ausgeschaltet werden.

Zur Adaption der Zellen an die Krebs-Ringer Lösung und an die Messtemperatur wurden die Zellen vor dem Start der Messung 45 Minuten in Krebs-Ringer Lösung mit basaler Glucose umströmt. Dies waren 3 mM Glucose, wenn MIN6-Zellen verwendet wurden und 5 mM Glucose, wenn primäre Beta-Zellen verwendet wurden. Die angegebene Vorlaufzeit von 45 Minuten verringerte sich auf 30 Minuten, wenn die Zellen vorher beladen wurden, da dies auch bei der verwendeten Messtemperatur in Krebs-Ringer Lösung mit basaler Glucose erfolgte. Während dieser Adaptionsphase war Zeit um einen passenden Bildausschnitt für die Messung zu wählen. Die jeweiligen, für die Messungen verwendeten, Messprotokolle wurden dann nach Ablauf der Adaptionszeit mit der Software LiveAquisition 2.4.0.17 (Till Photonics, Gräfeling, Deutschland) gestartet. Während der Messungen wurde der Raum abgedunkelt.

Verwendete Lösungen:

#### Krebs-Ringer Lösung mit basaler Glucose

Dieses war das verwendete Basismedium in allen Experimenten. Wie zuvor beschrieben wurde für MIN6-Zellen 3 mM Glucose als basale Glucose verwendet und im Gegensatz dazu 5 mM Glucose für primäre Beta-Zellen. Die Herstellung der Krebs-Ringer Lösung erfolgte im Prinzip wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, allerdings ohne den Einsatz von Albumin. Die Einwaage von Glucose Monohydrat betrug für eine Lösung mit 3 mM Glucose 59,5 mg Glucose auf 100 mL Krebs-Ringer Lösung und für eine Lösung mit 5 mM Glucose dem Entsprechend 99,1 mg Glucose auf 100 mL Krebs-Ringer Lösung.

#### Krebs-Ringer Lösung mit 15 mM Glucose

Lag die basale Glucose bei 3 mM mussten 12 mM Glucose (23,8 mg auf 10 mL) hinzugefügt werden, lag sie bei 5 mM Glucose mussten 10 mM Glucose (19,8 mg auf 10 mL) hinzugefügt werden.

#### Krebs-Ringer Lösung mit 30 mM Glucose

Lag die basale Glucose bei 3 mM mussten 27 mM Glucose (53,5 mg auf 10 mL) hinzugefügt werden, lag sie bei 5 mM Glucose mussten 25 mM Glucose (49,5 mg auf 10 mL) hinzugefügt werden.

#### Krebs-Ringer Lösung mit 15 mM K<sup>+</sup>

Einer Krebs-Ringer Lösung mit basaler Glucose Konzentration wurde 15 mM K<sup>+</sup>-Ionen hinzugefügt. Dafür wurden 6,8 mg KCl pro 10 mL Krebs-Ringer Lösung eingewogen und gelöst.

#### Krebs-Ringer Lösung mit 40 mM K<sup>+</sup>

Einer Krebs-Ringer Lösung mit basaler Glucose Konzentration wurde 40 mM K<sup>+</sup>-Ionen hinzugefügt. Dafür wurden 25,4 mg KCl pro 10 mL Krebs-Ringer Lösung eingewogen und gelöst.

#### Krebs-Ringer Lösung mit 0 mM Glucose

Der hergestellten Krebs-Ringer Lösung wurde keine Glucose hinzugefügt. Die entsprechende Menge musste also entnommen werden bevor die Krebs-Ringer Lösung mit basaler Glucose hergestellt wurde.

#### Krebs-Ringer Lösung mit 0 mM Glucose und 5 mM NaN<sub>3</sub>

Es wurden 50 µL einer 1 M NaN<sub>3</sub>-Stammlösung mit 9,95 mL einer Krebs-Ringer Lösung ohne Glucose gemischt.

Die NaN<sub>3</sub>-Stammlösung wurde durch das Lösen von 65 mg NaN<sub>3</sub> in 1 mL H<sub>2</sub>O bidest. hergestellt. Die Stammlösung wurde bei -20 °C gelagert.

#### Krebs-Ringer Lösung mit 0 mM Glucose und 10 mM NH<sub>4</sub>Cl

Es wurden 1 mL einer 100 mM NH<sub>4</sub>Cl-Stammlösung mit 9 mL einer Krebs-Ringer Lösung ohne Glucose gemischt.

Die  $\text{NH}_4\text{Cl}$  -Stammlösung wurde durch das Lösen von 53,5 mg  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in 10 mL Krebs- Ringer Lösung ohne Glucose hergestellt. Die Stammlösung wurde bei 4°C im Kühlschrank gelagert und bis zu maximal 3 Monate verwendet.

#### $\text{Ca}^{2+}$ -freie Krebs-Ringer Lösung mit EGTA

Einer  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Krebs-Ringer Lösung mit folgender Zusammensetzung der eingesetzten Stoffe (115 mM NaCl, 4,7 mM KCL, 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 20 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 10 mM HEPES und 5 mM Glucose) wurden 0,5 mM EGTA (7,6 mg auf 10 mL) hinzugefügt.

#### $\text{Ca}^{2+}$ -freie Krebs-Ringer Lösung mit EGTA + Ionomycin

Der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Krebs-Ringer Lösung mit EGTA wurden noch 20  $\mu\text{L}$  Ionomycin-Stammlösung in DMSO (Sarstedt) pro 10 mL Lösung zugesetzt. Daraus folgte eine Ionomycin-Konzentration von 2  $\mu\text{M}$ .

#### Krebs-Ringer Lösung mit 10 mM $\text{Ca}^{2+}$ + Ionomycin

Der normalen Krebs-Ringer Lösung mit basaler Glucose wurden 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (14,7 mg  $\text{CaCl}_2$  auf 10 mL) und 2  $\mu\text{M}$  Ionomycin (20  $\mu\text{L}$  einer 1 mM Stammlösung in DMSO auf 10 mL) hinzugefügt.

### **3.5.3 Messung der Epi-Fluoreszenz**

Im Epifluoreszenz-Modus trifft das Anregungslicht orthogonal auf die Probe und regt dadurch die Fluorophore im gesamten Cytosol der Zellen an.

#### **3.5.3.1 Cytosolische Calciumkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$**

Die cytosolische Calciumkonzentration wurde ratiometrisch mit dem Indikator Fura-2 LeakRes (AM) gemessen.

#### Indikator

Das Fura-2 LeakRes (AM) ist die Weiterentwicklung von Fura-2 (177). Das Indikatormolekül besteht aus einem komplexierenden und einem fluoreszierenden Teil (Fluorophor). Dabei basiert der komplexierende Teil auf der Struktur des Chelatbildners BAPTA (1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N,N-tetraacetic acid). Dieser ist in der Lage  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen mit seinen vier Carboxylgruppen und zu komplexieren, wobei sich das Energieniveau des Fluorophors und

damit sein Absorptionsspektrum hin zu kürzeren Wellenlängen ändert. Der eingesetzte Acetoxymethylester (AM) des Fura-2 ist lipophil und kann die Membran der Zellen passieren, in der Zelle wird er dann von zelleigenen Esterasen gespalten. Das nun deutlich hydrophilere Fura-2 kann die Membran nicht mehr so gut passieren. Trotzdem konnte bei längeren Versuchen eine Verminderung der Indikatorbeladung beobachtet werden, dies kann sowohl durch aktive Transport als auch durch passive Mechanismen (Leak) bedingt sein (178). Das hier eingesetzte Fura-2 LeakRes (AM) ist am Aromaten zusätzlich mit einer, über ein Ethylen verbundenen, 1-Carbonyl-Piperazinylelessigsäure substituiert und zeigt dadurch ein verringertes ausströmen des Farbstoffes aus der Zelle oder in intrazelluläre Kompartimente.

#### Messprinzip

Das Fura-2 LeakRes ist ein ratiometrischer Farbstoff, dessen Anregungsmaxima bei 340 nm (Fura-2 mit gebundenem  $\text{Ca}^{2+}$ ) und 380 nm (Fura-2 ohne  $\text{Ca}^{2+}$ ) liegen. Die Emission erfolgte in beiden Fällen bei 510 nm. Das bedeutet, dass ein Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zu einer stärkeren Fluoreszenzanregung mit Licht der Wellenlänge 340 nm und zu einer schwächeren Anregung mit Licht der Wellenlänge 380 nm führt.

Gemessen wurde die Ratio der Fluoreszenzintensität mit Anregungslicht der Wellenlänge 340 nm geteilt durch die Fluoreszenzintensität mit Anregungslicht der Wellenlänge 380 nm. Diese stieg mit Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ebenfalls. Der Effekt, der bei der Ratio-Messung zu sehen war, war deutlicher als der der einzelnen Wellenlängen. So wurde die dynamische Breite der Messung vergrößert. Ein weiterer Vorteil der Ratio-Messung war, dass diese nur abhängig von der cytosolischen Calciumkonzentration war, nicht aber von anderen Effekten wie der Beladungsmenge des Fluorophors, möglichem Ausbleichen des Fluorophors oder der Schichtdicke der Zellen.

#### Messung

Die Zellen wurden mit Fura-2 LeakRes (AM) beladen (1,6  $\mu\text{M}$ , 20 min), in die Kammer eingebaut und an die Umströmung angeschlossen (siehe: Kapitel 3.5.1). Während der Adaptation an die Umströmung und die Messtemperatur wurde anhand der Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm der Bildausschnitt für die Messung gewählt. Danach konnten in diesem Bildausschnitt die ROI (region of interest) gesetzt werden, dabei wurden 2 ROI zur Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz festgelegt, die von den anderen Werten abgezogen wurden. Der Rest markierte die sichtbaren fluoreszierenden Zellen. Nach der Adaption und der Auswahl es Bildausschnittes sowie der ROI wurde das entsprechende

Messprotokoll gestartet. Die Datenaufnahme erfolgte, indem kontinuierlich alle 10 s zwei Fluoreszenzbilder (340 nm, 380 nm) aufgenommen wurden. Dabei hat das Programm automatisch die bereinigten Ratio-Werte der gesetzten ROI bestimmt (Hintergrundfluoreszenz abgezogen).

#### Datenauswertung

Die Auswertung der aufgenommenen Daten erfolgte mit dem Programm Prism 5. Dabei wurde der Quotient der Fluoreszenzintensitäten (Anregung mit 340 nm geteilt durch Anregung mit 380 nm) als Verlauf über die Zeit angegeben und graphisch dargestellt. Diese Darstellung erfolgte als Mittelwert aus n Versuchen + SEM. Die Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen ungepaarten T-Test bestimmt und war bei  $P < 0,05$  gegeben.

#### Kalibrierung der Calcium-Messung mit Fura-2 und Angabe absoluter Konzentrationen

Um die Angabe absoluter Calciumkonzentrationen zu ermöglichen musste eine Kalibrierung vorgenommen werden. Hierfür wurden Zellen, wie vorher beschrieben, mit Fura-2 LeakRes beladen und in die Kammer eingebaut und an die Umströmung angeschlossen. Das Umströmungsprotokoll ist in **Abb 3.17** gezeigt.

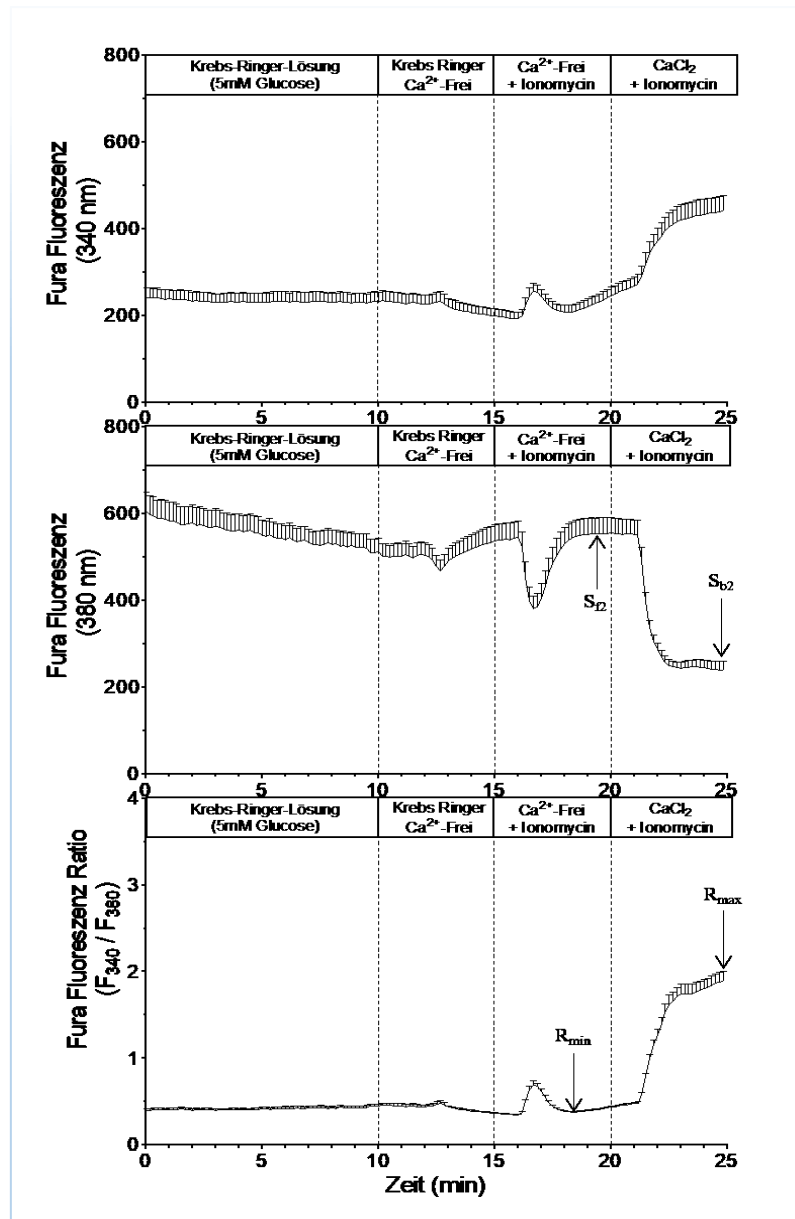


Abbildung 3.17: Kalibrierung der Cytosolischen Calcium-Konzentration

Das Umströmungsprotokoll für die Kalibrierung der cytosolischen Calcium-Konzentration hatte eine Länge von 65 Minuten. Davon waren 40 Minuten Vorlauf und 25 Minuten das eigentliche Kalibrierungsprotokoll, dabei war allen Lösungen 5 mM Glucose zugesetzt. Einzelne primäre Betazellen wurden zunächst nur mit Krebs-Ringer-Lösung umströmt. Von Minute 10 an wurde auf Calcium-freie Krebs-Ringer-Lösung gewechselt, die zusätzlich EGTA enthielt um eventuell vorhandene einzelne  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zu komplexieren. Nach 15 Minuten wurde zusätzlich Ionomycin hinzugefügt, welches Ionenporen in den Zellen bildete, wodurch das cytosolische Calcium aus der Zelle diffundieren konnte. Zum Schluss wurden die Zellen von Minute 20 – 25 mit Krebs-Ringer-Lösung umströmt, die Ionomycin und 10 mM  $\text{CaCl}_2$  enthielt. Während der Umströmung wurde die cytosolische Calcium-Konzentration mit Fura-2 LeakRes (AM) gemessen. Gezeigt sind die Fluoreszenzintensität bei einer Anregung sowohl mit 340 nm ( $\text{Ca}^{2+}$  gebunden) (A) als auch mit 380 nm (kein  $\text{Ca}^{2+}$  gebunden) (B). Zudem ist die Fluoreszenzratio (340 nm / 380 nm) dargestellt (C). Die in der Abbildung markierten Werte ( $R_{\min}$ ,  $R_{\max}$ ,  $S_D$ ,  $S_{b2}$ ) wurden zur Berechnung der absoluten Calcium-Konzentrationen aus den jeweiligen Ratio-Werten verwendet.

Das in der **Abbildung 3.17** gezeigte Umströmungsprotokoll simuliert die beiden Extremzustände, welche die cytosolische Calcium-Konzentration annehmen kann. Die Umströmung mit Calcium-freier Krebs-Ringen-Lösung, die sowohl EGTA, zur Komplexbildung von freiem  $\text{Ca}^{2+}$ , als auch Ionomycin, das Ionen-Poren in den Zellen bildete durch die das  $\text{Ca}^{2+}$  die Zellen verlassen konnte, enthielt, zeigte das Minimum der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Die Umströmung mit Krebs-Ringer-Lösung, die 10 mM  $\text{CaCl}_2$  und Ionomycin enthielt, zeigte das Maximum der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Dadurch konnten an diesen Kurven einige wichtige Parameter abgelesen werden, die nötig waren um die absolute Calcium-Konzentration ( $c[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) aus dem entsprechenden Wert der Fura-Ratio ( $R_i$ ) mittels folgender Gleichung zu berechnen.

**Formel 3.1: Berechnung der absoluten Calcium-Konzentration**

$$c[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d * \left( \frac{R_i - R_{\min}}{R_{\max} - R_i} \right) * \left( \frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right)$$

Die Parameter  $R_{\min}$  und  $R_{\max}$  sind dabei die Werte der Fura-Ratio bei minimaler oder maximaler messbarer Konzentration intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Das  $S_{f2}$  ist die Fura-Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm und einer minimalen Konzentration intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Das  $S_{b2}$  ist die Fura-Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm und einer maximalen Konzentration intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen.  $K_d$  ist die Dissoziationskonstante und beschreibt die Bindungsstärke der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an den Fura-2-Fluorophor. Diese Konstante konnte der Literatur entnommen werden und beträgt 224 nM (179).

### 3.5.3.2 Cytosolische Messung der ATP/ADP Ratio

Das Verhältnis von ATP zu ADP im Cytosol der Zellen wurde ratiometrisch mit dem Indikator PercevalHR gemessen. Die Korrektur der Messung hinsichtlich des pH-Wertes wurde mit dem pH-Indikator Carboxy SNARF-1 (AM) Acetat durchgeführt.

#### Indikatoren

##### 1. PercevalHR

Bei PercevalHR handelt es sich um die Weiterentwicklung von Perceval (175), mit dem das Verhältnis von ATP/ADP mit einer dynamischen Breite im Bereich von 1 – 5 bestimmt werden kann (180). Erst PercevalHR ist in der Lage das ATP/ADP-Verhältnis im physiologischen Bereich mit einer dynamischen Breite von 1 – 100 zu bestimmen (181,182). Bei PercevalHR handelt es sich um ein Fusionsprotein, das vorher je nach Zellart durch Transfektion oder Transduktion in die Zelle eingebracht werden muss. Das Fusionsprotein besteht aus zwei



Teilen, der Reporterdomäne und der Sensordomäne. Die Reporterdomäne ist eine zirkulär permutierte Form des Fluoreszenzproteins Venus (cpmVenus), bei der durch die zirkuläre Permutation der N- und der C-Terminus nun näher am inneren Fluorophor des Proteins liegen. Die sensorische Domäne besteht aus einem Homotrimer des Mg/ATP bindenden Proteins GlnK aus *Methanobacterium jannaschii*. Allerdings ist in diesem Homotrimer nur noch eine Mg/ATP bindende Domäne, die als T-Loop bezeichnet wird, vorhanden. Das PercevalHR ist so aufgebaut, dass die Reporterdomäne mit Hilfe von Peptid-Linkern in den Mg/ATP bindenden T-Loop der sensorischen Domäne integriert ist. Binden  $Mg^{2+}$  und ATP an der sensorischen Domäne so kommt es zu einer starken Konformationsänderung im T-Loop, was die lokale Umgebung des Fluorophors verändert und zu einer Änderung der Anregungswellenlängen hin zu höheren Wellenlängen führt (183). Wie die meisten zirkulär permutierten Fluoreszenzproteine ist allerdings auch die Reporterdomäne (das cpmVenus) pH sensitiv, deshalb ist außerdem eine pH-Korrektur der Messung nötig. Dies kann entweder über eine ko-Expression des pH-Sensors pH-Red erfolgen oder durch das hier verwendete Sensormolekül Carboxy SNARF-1 (AM).

## **2. Carboxy SNARF-1 (AM) Acetat**

Carboxy SNARF-1 AM ist ein Sensormolekül, das verwendet wird um den intrazellulären pH-Wert zu bestimmen. Eine Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes verschiebt dabei sowohl die Anregungswellenlänge als auch die Emissionswellenlänge hin zu höheren Wellenlängen. Auch in diesem Fall sorgt der Acetoxymethylester (AM) für eine erleichterte Aufnahme in die Zellen. Dort wird er von Esterasen gespalten, was dann das Verlassen des Farbstoffes aus der Zelle erschwert.

### Messprinzip

#### **1. PercevalHR**

PercevalHR ist ein ratiometrischer Farbstoff mit einer hohen Bindungsaffinität für einerseits  $Mg^{2+}$  und ATP und andererseits ADP, sodass in der Zelle immer eines der beiden Moleküle gebunden ist. Die Anregungsmaxima liegen bei 420 nm (ADP gebunden) und 500 nm (Mg/ATP gebunden) und der isosbestische Punkt, an dem die Anregungsintensität unabhängig von Bindungspartner ist, liegt bei 455 nm. Das Emissionsmaximum ist in jeden Fall 510 nm. Das bedeutet, dass ein Anstieg des ATP/ADP Verhältnisses zu einer stärkeren Fluoreszenzanregung mit Licht der Wellenlänge 500 nm und zu einer schwächeren Anregung

mit Licht der Wellenlänge 420 nm führt. Allerdings aber keinen Einfluss auf die Fluoreszenzanregung mit Licht der Wellenlänge 455 nm hat.

Bei der durchgeführten Messung wurde die Ratio der Fluoreszenzintensität mit Anregungslicht der Wellenlänge 490 nm geteilt durch die Fluoreszenzintensität mit Anregungslicht der Wellenlänge 400 nm aufgenommen. Die Abweichung von den Anregungsmaxima war durch den eingesetzten Quad-Filter bedingt, der bei den verwendeten Wellenlängen eine höhere Durchlässigkeit für das Anregungslicht zeigte. Stieg bei dieser Messung nun das ATP/ADP Verhältnis, so stiegen die gemessenen Ratio-Werte ebenfalls. Die Vorteile der Ratio-Messung waren hier die Gleichen, die schon für das Fura-2 beschrieben wurden.

## **2. Carboxy SNARF-1 (AM)**

Beim Carboxy SNARF-1 (AM) handelt es sich um einen, in zweierlei Hinsicht, ratiometrischen pH-Sensor. Die lokalen Anregungsmaxima liegen bei 500 nm (niedriger pH-Wert, z.B. pH 6) und 560 nm (hoher pH-Wert, z.B. pH 9). Die lokalen Emissionsmaxima liegen bei 580 nm (niedriger pH-Wert, z.B. pH 6) und 640 nm (hoher pH-Wert, z.B. pH 9). Das bedeutet, dass eine Erhöhung des pH-Wertes zu einer stärkeren Anregung mit Licht der Wellenlänge 560 nm und zu einer schwächeren Anregung mit Licht der Wellenlänge 500 nm führt. Außerdem führt die Erhöhung des pH-Wertes zu einer gesteigerten Fluoreszenz-Emission bei 640 nm und zu einer verringerten Emission bei 580 nm.

Vom Hersteller wurde eine Anregung bei 560 nm und eine ratiometrische Messung der Emission empfohlen, bei der die gemessene Fluoreszenzintensität bei 640 nm durch die bei 580 nm geteilt werden sollte. Da dies aufgrund der vorhandenen Filter nicht möglich war und nur die Emission zwischen 580 nm und 620 nm aufgenommen werden konnte, wurde eine ratiometrische Anregung durchgeführt. Dabei wurde die Emission bei einer Anregungswellenlänge von 560 nm geteilt durch die Emission bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm gemessen. Im Hinblick auf die Anregungswellenlängen stiegen dabei die gemessenen Ratio-Werte bei steigenden pH-Wert, sodass die dynamische Breite höher sein sollte als bei einer Messung der einzelnen Wellenlängen. Allerdings war der Effekt der gemessenen Emissionsfluoreszenz auf den pH-Wert umgekehrt. Diese sank also bei steigendem pH-Wert, was die dynamische Breite der Messung wieder verringerte. Ansonsten galten aber auch hier die Vorteile, die vorher für Ratio-Messungen beschrieben wurden.

#### Messung

Die zuvor mit PercevalHR transduzierten Zellen (siehe: Kapitel 3.4.5), wurden mit Carboxy SNARF-1 (AM) beladen (3,5  $\mu$ M, 20 min), in die Kammer eingebaut und an die Umströmung angeschlossen (siehe: Kapitel 3.5.1). Während der Adaptation an die Umströmung und die Messtemperatur wurde anhand der Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm der Bildausschnitt für die Messung gewählt, dabei wurden die Emissionen der beiden Fluorophore mit dem Dichotom getrennt. Danach konnten in diesem Bildausschnitt die ROI (region of interest) gesetzt werden, dabei wurden 2 ROI zur Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz festgelegt, die von den anderen Werten abgezogen wurde. Der Rest markierte die sichtbaren fluoreszierenden Zellen. Nach der Adaption und der Auswahl es Bildausschnittes sowie der ROI wurde das entsprechende Messprotokoll gestartet. Die Datenaufnahme erfolgte, indem kontinuierlich alle 10 s 6 Fluoreszenzbilder (400 nm, 490 nm, 560 nm; jeweils 2 pro Wellenlänge) aufgenommen wurden, dabei hat das Programm automatisch die bereinigten Ratio-Werte der gesetzten ROI bestimmt (Hintergrundfluoreszenz abgezogen).

#### Datenauswertung

Die Auswertung der aufgenommenen Daten erfolgte mit dem Programm Prism 5. Dabei wurde der Quotient der Fluoreszenzintensitäten, sowohl für PercevalHR (490 nm/400 nm) als auch für Carboxy SNARF-1 (AM) (560 nm/490 nm) als Verlauf über die Zeit angegeben und graphisch dargestellt. Die beiden aufgenommenen Ratio-Verläufe wurden während der Messung mit Hilfe eines, mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  erzeugten, pH-Peaks bei minimaler ATP-Konzentration normiert. Dabei wurde das lokale Fluoreszenzminimum vor dem pH-Peak für beide Fluorophore auf 100% gesetzt und das Maximum während des pH-Peaks auf 200%. Mit diesen normierten Werten wurde dann der Quotient aus PercevalHR-Fluoreszenz und SNARF-Fluoreszenz ermittelt um den pH-bereinigten Verlauf der PercevalHR-Fluoreszenz zu erhalten um damit Rückschlüsse auf das ATP/ADP-Verhältnis zu ziehen. Diese Darstellung erfolgte als Mittelwert aus n Versuchen + SEM. Die Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen ungepaarten T-Test bestimmt und war bei  $P < 0,05$  gegeben.

### 3.5.4 TIRF-Mikroskopische Untersuchungen

Bei der TIRF-Mikroskopie trifft das Anregungslicht oberhalb eines kritischen Winkels auf eine Grenzfläche auf, die von einem optisch dichteren Medium (hier: das Deckgläschen;  $\eta_1 = \text{ca. } 1,5$ ) in ein optisch dünneres Medium (hier: wässrige Lösung oder die Zelle;  $\eta_2 = \text{ca. } 1,3$ ) führt. Dabei kommt es zur Totalreflektion des Anregungslichtes. Die Berechnung des kritischen Winkels ist mit Hilfe des hier dargestellten Snellius'schen Gesetzes möglich.

**Formel 3.2: Snellius'sches Gesetz**

$$\theta_c = \arcsin \frac{\eta_2}{\eta_1}$$

Bei der Totalreflektion entsteht ein elektromagnetisches Feld, das so genannte Evaneszente Feld, das sich von der Grenzfläche aus in das optisch dünnere Medium ausbreitet und dabei exponentiell abklingt. Dies ermöglicht die Anregung von Fluorophoren in einem sehr schmalen Bereich (100 - 200 nm) direkt an der Plasmamembran der untersuchten Zellen. Dadurch werden störende Fluoreszenzsignale aus dem inneren der Zelle vermieden. Die TIRF-Mikroskopie ist dementsprechend sehr gut geeignet um selektiv Strukturen (Granula und Aktin) und Prozesse (Granula-Dynamik) in oder an der Plasmamembran der Zellen, mit einer sehr hohen Auflösung in der z-Dimension, darzustellen.

#### 3.5.4.1 Messung der Anzahl und Dynamik von Insulingranula

##### Visualisierung der Insulin-Granula

Es wurden zwei verschiedene Fusionsproteine verwendet um jeweils verschiedene Strukturen im Inneren der Insulin-Granula zu markieren. So wurde mit dem Fusionsprotein aus humanem Insulin und EGFP (hIns-EGFP) der kondensierte Insulin-Zink-Kern der Granula markiert. Mit dem Fusionsprotein aus dem murinen C-Peptid und emGFP (mIns-C-emGFP) wurde im Gegensatz dazu der Bereich um den kondensierten Kern markiert in dem sich das C-Peptid in Lösung befand.

##### Messung

Die zuvor mit hIns-EGFP oder mIns-C-emGFP transduzierten Zellen (siehe: Kapitel 3.4.5), wurden in die Kammer eingebaut und an die Umströmung angeschlossen (siehe: Kapitel 3.5.1). Während der Adaption wurde der Bildausschnitt für die Messung so gewählt, dass im gesamten

Bildbereich nur eine Zelle zu sehen war. Dafür konnte der dargestellte Bildbereich im Programm verkleinert werden. Dies geschah im TIRF-Modus während der Anregung mit dem 491 nm Laser. Nach der Adaption und der Auswahl des Bildausschnittes wurde die Messung gestartet. Die Datenaufnahme erfolgte bei diesen Messungen nicht kontinuierlich, wie bei der Epifluoreszenz. Im Gegensatz dazu wurden, abhängig vom Versuchsprotokoll, repräsentative Zeitpunkte bestimmt an denen Bildersequenzen von 200 Bildern mit einer Frequenz von 8 Hz aufgenommen wurden. Die Aufnahme dieser Sequenzen dauerte etwa 25 Sekunden.

#### Datenauswertung

Die Einzelbilder in den aufgenommenen Sequenzen wurden im Tiff-Format gespeichert und in Matlab mit einem speziell dafür geschriebenen Programm ausgewertet (168). Von dem Programm sollten die Bewegungsmuster und das Exozytoseverhalten der Granula ausgewertet werden. Um das Exozytoseverhalten zu bestimmen gab es zusätzlich auch noch eine visuelle Kontrolle der Bildersequenzen. Die statistische Auswertung der dabei erhaltenen Daten erfolgte in Prism 5. Die Darstellung erfolgte als Mittelwert aus n Versuchen  $\pm$  SEM, der als nach oben und unten gerichtete Balken dargestellt wurde. Die Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen ungepaarten T-Test oder dem einfaktoriellen ANOVA bestimmt und war bei  $P < 0,05$  gegeben.

#### Matlab-Software:

Bei der Auswertung in Matlab wurde jedem Granulum zunächst eine eigene Identifikationsnummer (ID) zugewiesen. Die geschah aufsteigend in der Reihenfolge der Detektion. Diese Granula konnten dann anhand ihrer ID während der Messung verfolgt werden. Dadurch war es möglich neben statischen Parametern, wie die Anzahl der Granula, auch dynamische Angaben zu den Granula zu machen. Die detektierten Granula wurden dazu zunächst, anhand ihrer Verweildauer im evaneszenten Feld, in Sub-Populationen unterteilt. Die erste Gruppe waren die Granula, die maximal acht Bilder, das heißt eine Sekunde, im evaneszenten Feld verblieben. Diese Gruppe wurde entsprechend als Short-term Resident Granules bezeichnet und als prozentualer Anteil der gesamten Granula in der Sequenz (Total Granule Number per Sequence) angegeben. Eine Zweite Gruppe waren die Long-term Resident Granules, die durch ihre Eigenschaft definiert waren die gesamte Sequenz im evaneszenten Feld zu verbleiben. Diese wurden als prozentualer Anteil der Granula im ersten Bild (Granule Number [First Image]) angegeben. Um die Beweglichkeit der Granula orthogonal zur Plasmamembran zu beschreiben wurden die Arriving Granules und die Departing Granules bestimmt. Diese wurden anhand des Mittelwertes der prozentualen Abnahme beziehungsweise Zunahme der Granula über alle Bilder der Sequenz definiert und waren stets fast gleich groß.

Die Bewegung der Granula parallel zur Plasmamembran wurde mit dem Caging Diameter angegeben. Der Caging Diameter ist definiert als die Distanz zwischen den beiden am weitesten voneinander entfernten Punkten an denen ein Granulum auf seiner Wegstrecke in einem definierten Zeitraum detektiert wurde. Ein Zeitfenster von neun Bildern wurde dabei als geeignet festgelegt, da es gerade so lang war um die Subpopulation der Short-term Resident Granules aus diesem Parameter auszuschließen. Die Angabe des Caging Diameter erfolgte dann als  $CD_{50}$ , dem Caging Diameter bei einer halbmaximalen Häufigkeit der Granula-Gesamtpopulation. Die Bezeichnungen der Parameter und deren Erklärung sind zusätzlich in **Tabelle 3.6** dargestellt. Für eine übersichtliche Darstellung der oben genannten Parameter wurden diese normiert, wobei der Wert für die erste Sequenz des Experiments für alle Parameter auf 100 % festgelegt wurde.

Damit das Programm die Exozytose der Insulin-Granula auch als solche erkannte, mussten einige besondere Voraussetzungen erfüllt werden. Das erste war die schlagartige Erhöhung der Fluoreszenzintensität eines Granulums, die sich im Video als Blitz darstellte, gefolgt von einem schnellen Verschwinden der Fluoreszenz in der Form einer sich auflösenden Wolke (168,169).

Tabelle 3.6: Bezeichnung und Erklärung der Granula-Parameter

Bezeichnung	Erklärung
Granule Number (First Image)	Anzahl der Granula im ersten Bild
Total Granule Number per Sequence	Gesamtzahl der identifizierten Granula in der gesamten Sequenz (200 Bilder)
Short-term Resident Granules	Granula, die maximal eine Sekunde (8 Bilder) im TIRF-Feld zu sehen waren. Ausgegeben ist der prozentuale Anteil der Total Granule Number per Sequence
Long-term Resident Granules	Granula, die sich während der gesamten Sequenz (200 Bilder) im TIRF-Feld befanden. Ausgegeben ist der prozentuale Anteil der Granule Number (First Image)
Arriving Granules (Difference between Images)	Granula, die von einem zum nächsten Bild neu im TIRF-Feld erschienen. Dabei wurde der prozentuale Anteil der ankommenden Granula an der Anzahl in dem Bild bestimmt (ab Bild 2). Angegeben ist der Mittelwert aus allen Anteilen.
Departing Granules (Difference between Images)	Granula, die von einem zum nächsten Bild aus dem TIRF-Feld verschwanden. Dabei wurde der prozentuale Anteil der verschwundenen Granula an der Anzahl in dem Bild bestimmt (ab Bild 2). Angegeben ist der Mittelwert aus allen Anteilen.
Caging Diameter (at Half-Maximal Abundance)	Maximale Distanz zweier Aufenthaltsorte die ein Granulum in einem bestimmten Zeitfenster einnimmt. Das Zeitfenster wurde auf 9 Bilder festgelegt, was die Short-term Resident Granules ausschloss. Für jedes Granulum wurde ein Mittelwert über die Sequenz bestimmt. Angegeben ist der Caging Diameter bei einer halbmaximalen Häufigkeit der gesamten Granula Population.

### 3.5.4.2 Parallele Untersuchung des Aktin-Zytoskeletts und der Insulin-Granula

#### Visualisierung des Aktin-Zytoskeletts

Das Aktin-Zytoskelett wurde mit dem Fusionsprotein mTagRFP-T-Lifeact7 sichtbar gemacht, welches aus einem fluoreszierenden Teil (mTagRFP) und einem Aktin-bindenden Teil (Lifeact) besteht. Das Lifeact wurde entwickelt um Aktin-Strukturen in vivo zu markieren, ohne ihre Dynamik zu stören (174). Bei Lifeact handelt es sich um ein Peptid, das aus den ersten 17 Aminosäuren, also der Aktin-bindenden Sequenz, des Proteins ABP140 besteht. Das ABP140 ist in Vertretern der Familie *saccharomyces cerevisiae* konserviert, allerdings bisher in keinen anderen Organismen nachgewiesen worden.

#### Messung

Das Aktin-Zytoskelett und die Insulin-Granula wurden bei diesen Experimenten parallel betrachtet. Dafür wurden die Zellen mit hIns-EGFP und mTagRFP-T-Lifeact7 ko-transduziert (siehe: Kapitel 3.4.5) und in die Kammer eingebaut und an die Umströmung angeschlossen (siehe: Kapitel 3.5.1). Während der Adaption wurde der Bildausschnitt für die Messung so gewählt, dass im gesamten Bildbereich nur eine Zelle zu sehen war. Dafür konnte der dargestellte Bildbereich im Programm verkleinert werden. In diesem Fall musste außerdem darauf geachtet werden, dass sowohl für die Auswahl der Zelle als auch für die Messung das Kamerabild mit dem Dichotom geteilt werden musste. Dadurch konnten die Fluoreszenzen der Granula (grün) und des Aktins (rot) parallel detektiert werden. Die Auswahl des Bildausschnittes erfolgte wieder im TIRF-Modus während der Anregung mit dem 491 nm Laser. Dabei war es von Vorteil, wenn Fluoreszenzintensitäten der Granula und des Aktins möglichst ähnlich waren. Nach der Adaption und der Auswahl es Bildausschnittes wurde die Messung gestartet.

#### Datenauswertung

Die Auswertung der Mobilität und Anzahl der submembranären Granula erfolgte wie zuvor beschrieben. Die Bilder des Aktin-Zytoskeletts wurden qualitativ beschrieben und die Effekte einzelner Wirkstoffe untereinander verglichen.



### 3.5.5 Markierung der Mitochondrien

Die Markierung der Mitochondrien in den Zellen (MIN6 oder primäre Beta-Zellen) erfolgte mit dem kationischen Farbstoff TMRE, der in der Lage war ungehindert durch die Membranen der Zellen zu diffundieren. Die selektive Markierung der Mitochondrien funktioniert, weil die Fluoreszenz des TMRE im wässrigen Cytosol gequencht wurde und so nur in unpolaren Umgebungen wie Membranen sichtbar war. Dazu kam die Tendenz sich abhängig vom Membranpotenzial in die innere Membran der Mitochondrien einzulagern, wo der Farbstoff dann fluoreszierte. Da diese Akkumulation in die innere mitochondriale Membran direkt abhängig vom Betrag des negativen Membranpotentials war, könnte mit TMRE neben der Visualisierung der Mitochondrien auch die Änderung ihres Membranpotentials gemessen werden.

Für die Messung wurde zunächst eine 1 mM Stammlösung (0,515 mg in 1 mL DMSO) des TMRE hergestellt. Diese wurde am Tag der Messung auf eine Konzentration von 1  $\mu$ M mit Krebs-Ringer Lösung verdünnt. Die verdünnte Lösung wurde nur für diesen Tag verwendet. Für die Beladung der Zellen mussten schließlich 975  $\mu$ L Krebs-Ringer Lösung mit 20  $\mu$ L der verdünnten TMRE-Lösung gemischt werden, was in einer 20 nM TMRE-Lösung resultierte, die dann für die Beladung auf die Zellen gegeben wurde. Die Beladungszeit lag bei 20 Minuten. Da die mit TMRE beladenen Zellen danach nicht mit einem Perfusionsprotokoll umströmt wurden, konnten sie, statt in die Umströmungskammer eingebaut zu werden, auf einem Objektträger befestigt werden. Dieser Objektträger hatte eine Mulde im Glas, in die Krebs-Ringer Lösung pipettiert wurde. Das Deckgläschen wurde dann so auf den Objektträger gelegt, dass die Zellen in die Krebs-Ringer Lösung ragten. Von diesen, mit TMRE beladenen Zellen, wurden dann ausschließlich Einzelbilder oder kurze Videos gemacht.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Einfluss eines maximal effektiven Glucose-Stimulus und einer maximal effektiven Kaliumdepolarisation auf perifundierte primäre Beta-Zellen

Viele Forschungsgruppen nutzen die Depolarisation von Beta-Zellen mit hohen Kaliumkonzentrationen (40 – 70 mM) als Modell für die erste Phase der Glucose-induzierten Insulinsekretion. Der Vergleich der Wirkung einer Kalium-Depolarisation mit Glucose-induzierten Effekten war bereits im Rahmen einer vorangegangenen Dissertation durchgeführt worden und zwar mit jeweils nahezu maximal wirksamer Konzentration, d.h. 30 mM Glucose und 40 mM KCl.

Hier sollten zunächst mit den gleichen Stimuli die Reaktionen von primären Maus-Inseln und primären Beta-Zellen charakterisiert werden. Die Zellen wurden 90 Minuten lang umströmt. Davon entfielen 40 Minuten auf die Vorlaufphase, in der sich die zuvor in Kultur befindlichen Zellen in der Umströmung stabilisieren konnten und 50 Minuten auf das eigentliche Experiment. In den Experimenten wurden die Zellen nach 10 Minuten mit dem ersten Stimulus umströmt. Nach einer daran anschließenden 10-minütigen Auswaschphase wurden die Zellen für 10 Minuten mit dem zweiten Stimulus umströmt. Auch dieser wurde 10 Minuten ausgewaschen. Die Phasen der Stimulation waren 10 Minuten lang, weil in den Experimenten die Einflüsse der Stimuli auf die erste Phase der Insulinsekretion betrachtet werden sollten. Die Stimuli wurden dabei in beiden Reihenfolgen (erst KCl dann Glucose; erst Glucose dann KCl) untersucht, um den möglichen Einfluss des ersten Stimulus auf den zweiten Stimulus mit abbilden zu können.

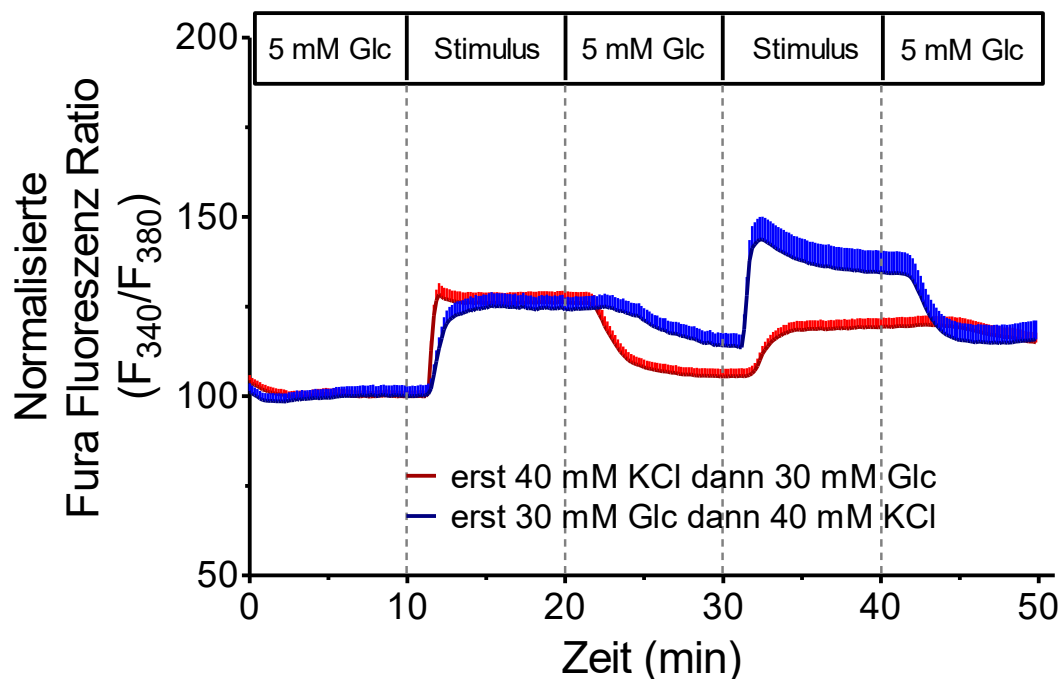
#### 4.1.1 Messung der cytosolischen Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in einzelnen Beta-Zellen während der Stimulation mit 30 mM Glucose und 40 mM KCl

Der Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  gilt als entscheidendes Signal für die Fusion der Insulin-Granula mit der Plasmamembran der Beta-Zelle. Die  $[Ca^{2+}]_i$  wurde mit dem Farbstoff Fura2-AM LeakRes gemessen und als Fura Fluoreszenz Ratio angegeben. Für die Versuche wurde das zuvor beschriebene Umströmungsprotokoll (siehe: Kapitel 4.1) verwendet.

Um die Messungen der  $[Ca^{2+}]_i$  sowohl mit den Messungen der Insulinsekretion als mit dem TIRF-Mikroskopischen Experimenten vergleichen zu können, sollte die Fura Fluoreszenz Ratio

von primären Maus-Inseln und einzelnen Beta-Zellen bei 37°C miteinander verglichen werden. Dafür wurde zunächst der Verlauf der  $[Ca^{2+}]_i$  in Maus-Inseln bei 37°C untersucht.

40 mM KCl sorgte für einen schnellen, steilen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  mit einem überschießenden initialen Peak, während 30 mM Glucose für einen langsameren moderaten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  sorgte, der allerdings länger anhielt. Die Reihenfolge der beiden Stimuli hatte in dieser Messung einen entscheidenden Einfluss. Wurde KCl als erster Stimulus verwendet, hat es die Wirkung des nachfolgenden Glucose-Stimulus geschwächt. Umgekehrt hat ein zuerst eingesetzter Glucose-Stimulus die Wirkung einer nachfolgenden Depolarisation durch KCl verstärkt (**Abbildung 4.1**).



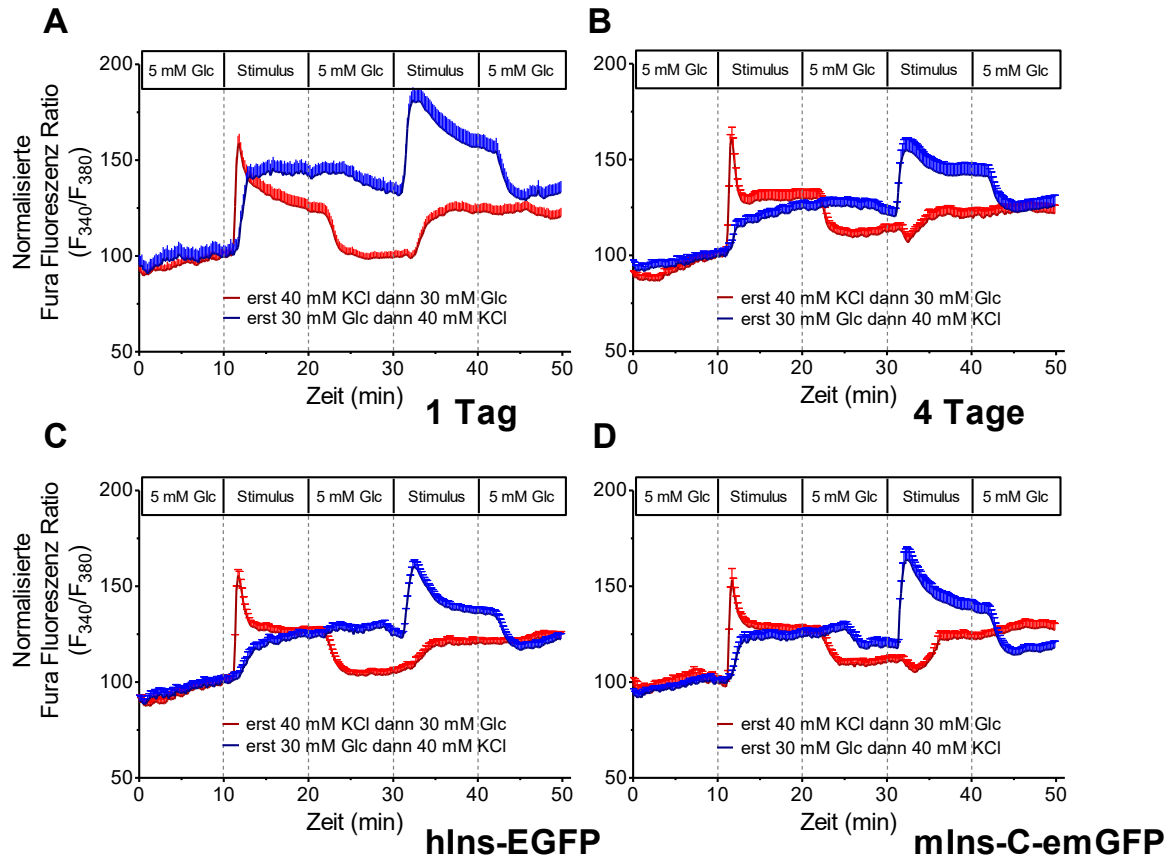
**Abbildung 4.1:** Einfluss von 40 mM KCl oder 30 mM Glucose auf die  $[Ca^{2+}]_i$  von Pankreas-Inseln aus NMRI-Mäusen

Die Pankreasinseln der NMRI-Mäuse wurden 50 Minuten lang mit Krebs-Ringer-Lösung umströmt. Von Minute 10 – 20 wurde die Konzentration der Kalium-Ionen auf 40 mM erhöht und die Glucose-Konzentration wurde von Minute 30 – 40 auf 30 mM erhöht (**Rot**). Die Stimuli wurden auch in umgekehrter Reihenfolge eingesetzt (**Blau**). Die Kurven wurden zu Minute 10 auf den Wert 100 normalisiert, da die Effekte der Stimuli auf diese Weise besser zu vergleichen waren. Vorher gab es einen leichten, jedoch signifikanten Unterschied in der prästimulatorischen Fura-Ratio. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte + SEM aus 4 (erst Glucose) oder 5 (erst KCl) Versuchen.

Im nächsten Schritt sollten die Ergebnisse der Maus-Inseln mit denen von primären Einzelzellen verglichen werden. Dabei zeigte sich, dass die einzelnen Beta-Zellen das 90-

minütige Versuchsprotokoll bei 37 °C nicht unbeschadet überstanden. Das wurde klar, weil die Beta-Zellen bei dieser Temperatur nicht in der Lage waren die  $[Ca^{2+}]_i$  nach einer Stimulation mit 40 mM KCl wieder auf basale Werte zu senken. Da die Beta-Zellen allerdings bei 32 °C ausreichend stabil waren, wurden alle Experimente an einzelnen Beta-Zellen bei 32 °C durchgeführt. Außerdem wurde der Einfluss der viralen Transduktion, die für die Messung der Granula-Mobilität nötig ist, und der damit einhergehenden Zellkulturdauer von 4 Tagen auf die  $[Ca^{2+}]_i$  überprüft.

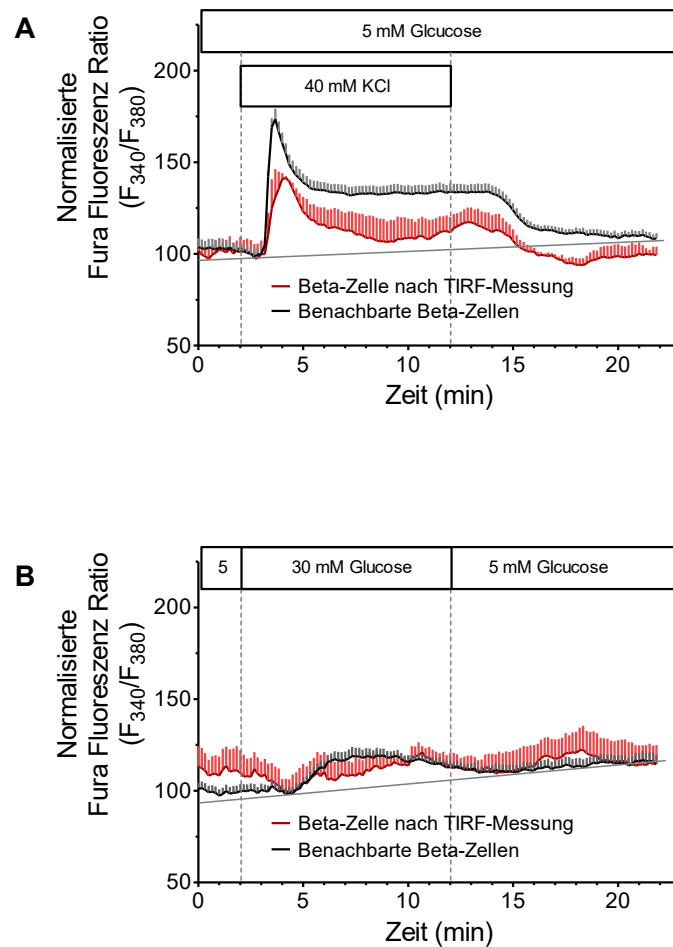
Die Abbildung zeigt die  $[Ca^{2+}]_i$  in einzelnen Beta-Zellen nach einem Tag Zellkultur, nach vier Tagen Zellkultur ohne Transduktion und nach vier Tagen Zellkultur nach Transduktion mit den Granula-Labeln hIns-EGFP und mIns-C-emGFP. Es ist zu sehen, dass die Reaktion der  $[Ca^{2+}]_i$  auf die beiden Stimuli in einzelnen Beta-Zellen und in den Maus-Inseln prinzipiell gleich verlief. Wobei die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  durch die Stimuli in den Einzelzellen stärker ausfiel als bei den Inseln (**Abbildung 4.2A**). Der generelle Verlauf der  $[Ca^{2+}]_i$  wurde weder durch die Zellkulturdauer (**Abbildung 4.2B**), noch durch die virale Transduktion der Zellen verändert (**Abbildung 4.2C + 4.2D**). Allerdings war die Fähigkeit beider Stimuli, die  $[Ca^{2+}]_i$  zu erhöhen nach 4 Tagen Zellkultur leicht geschwächt. Dieser Effekt war aber unabhängig von der viralen Transduktion.



**Abbildung 4.2: Effekt von 40 mM KCl oder 30 mM Glucose auf die  $[Ca^{2+}]_i$  einzelner Beta-Zellen und Einfluss von Zellkulturdauer und viraler Transduktion**

Die Beta-Zellen wurden 50 Minuten lang mit Krebs-Ringer-Lösung umströmt. Von Minute 10 – 20 wurde die Konzentration der Kalium-Ionen auf 40 mM erhöht und die Glucose-Konzentration wurde von Minute 30 – 40 auf 30 mM erhöht (**Rot**). Die Stimuli wurden auch in umgekehrter Reihenfolge eingesetzt (**Blau**). Die Messungen wurden nach einem Tag in der Zellkultur (**A**) und nach vier Tagen in der Zellkultur (**B-D**) durchgeführt. Nach vier Tagen erfolgte die Messung an nicht-transduzierten Zellen (**B**) und an Zellen, die mit hIns-EGFP (**C**) oder mIns-C-emGFP (**D**) transduziert wurden. Die Kurven wurden zu Minute 10 auf den Wert 100 normalisiert, da die Effekte der Stimuli auf diese Weise besser zu vergleichen waren. Vorher gab es einen leichten, nicht signifikanten Unterschied in der prästimulatorischen Fura-Ratio. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte + SEM aus 2 Versuchen (D, erst KCl), aus 3 Versuchen (A, erst Glc; B, erst KCl; C, erst Glc; D, erst KCl) oder aus 4 Versuchen (A, erst KCl; B, erst Glc; C, erst KCl).

Zuletzt wurde der Einfluss der Fluoreszenzanregung im Rahmen der TIRF-Messungen auf die  $[Ca^{2+}]_i$  der Beta-Zellen untersucht. Dabei wurde der Verlauf der  $[Ca^{2+}]_i$  nach 2 TIRF-Sequenzen, welche mit einem Abstand von 9 Minuten aufgenommen worden waren, untersucht. Direkt nach der Aufnahme der beiden Sequenzen wurde die Messung auf Epifluoreszenz umgeschaltet und die  $[Ca^{2+}]_i$  gemessen. Dabei wurde in separaten Messungen der Einfluss der beiden Stimuli auf die  $[Ca^{2+}]_i$  der vorher belichteten Zellen gemessen und mit den nicht belichteten Zellen in der Umgebung verglichen.



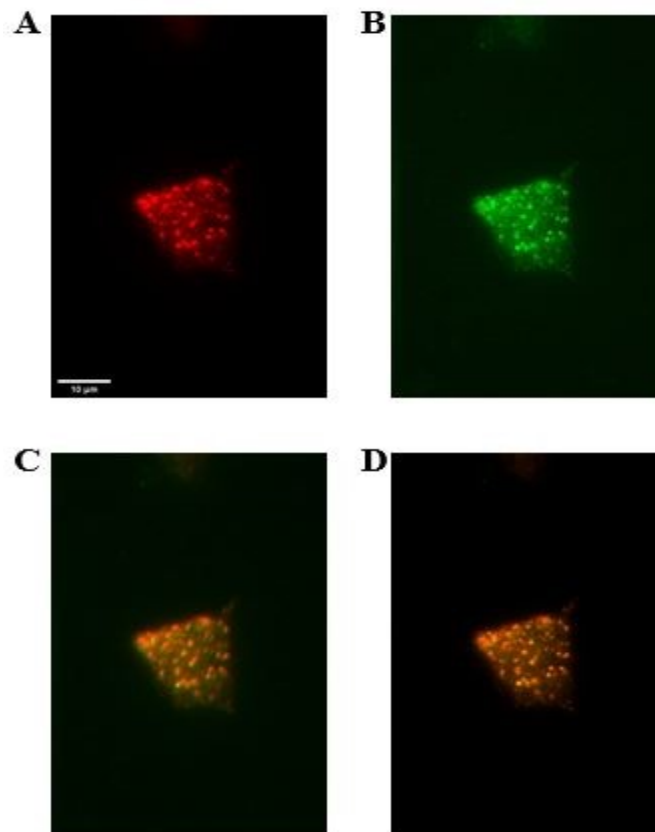
**Abbildung 4.3:** Einfluss der Belichtung auf die  $[Ca^{2+}]_i$  während der Aufnahme der Bildersequenzen im TIRF-Modus

Nach der Aufnahme zweier Bildersequenzen im TIRF-Modus (200 Bilder; 8 Hz) wurden die Beta-Zellen 22 Minuten lang mit Krebs-Ringer-Lösung umströmt. Von Minute 2 – 12 wurde entweder die Konzentration der Kalium-Ionen auf 40 mM (A) oder die Glucose-Konzentration auf 30 mM erhöht (B). Die  $[Ca^{2+}]_i$  wurde von den jeweils im TIRF-Feld beleuchteten Zellen (**Rote Linie**) und den nicht belichteten Zellen in der Umgebung (**Schwarze Linie**) gemessen. Die Kurven wurden transformiert und zu Minute 10 auf den Wert 100 normalisiert, da die Effekte der Stimuli auf diese Weise besser zu vergleichen waren. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte + SEM aus 3 (40 mM KCl) oder 4 (30 mM Glucose) Versuchen.

Diese Experimente ergaben, dass die  $[Ca^{2+}]_i$  der zuvor der Fluoreszenzanregung ausgesetzten Zellen zwar anfangs leicht erhöht war, unter Stimulation jedoch den gleichen Verlauf der  $[Ca^{2+}]_i$  zeigten wie benachbarte Zellen, die vorher nicht der Fluoreszenzanregung ausgesetzt waren (**Abbildung 4.3**).

### 4.1.2 Fluoreszenzmarkierung der Insulin-Granula

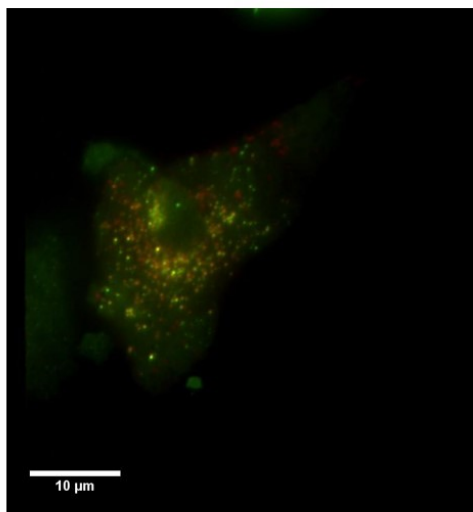
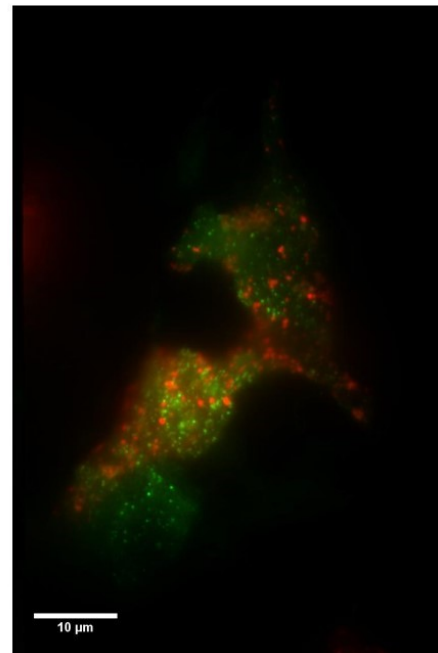
Bereits 2004 wurde von MICHAEL ET AL. gezeigt, dass die Art des Granula-Labels einen Einfluss auf die Messung der Exozytose hat (184). Aus diesem Grund wurden für die Markierung der Insulin-Granula in den TIRF-mikroskopischen Experimenten zwei unterschiedliche Label (Insulin [hIns]; C-Peptid [mIns-C]) verwendet. Damit sollte überprüft werden, ob und inwiefern die Fluoreszenzproteine einen eigenen Effekt auf Beweglichkeit und Fusion der Granula haben.



**Abbildung 4.4: Projektion zweier Fluoreszenzen aufeinander und Korrektur der Versatzes der Fluoreszenzbilder**

MIN6-Zellen wurden mit fluoreszierenden Fusionsprotein hIns-tDimer transfiziert. Die Bilder zeigen die rote Fluoreszenz des tDimer (A), die grüne Fluoreszenz des tDimer (B) und die Projektion der beiden Floreszenzen aufeinander, einmal ohne (C) und einmal mit Versatzkorrektur (D). Durch die Korrektur des Versatzes erschienen Granula, die in beiden Fluoreszenzkanälen (Rot / Grün) auftauchten in Gelb. So konnte im Folgenden bei der Betrachtungen der ko-Lokalisation der Granula untersucht werden, ob die Granula, die mit den verschiedenen Labeln markiert wurden, biologisch gleich waren oder ob es systematische Unterschiede zwischen ihnen gab. Maßstabsbalken = 10 µm

Die Versuche zur Untersuchung der Granula-Markierung wurden an ko-transfizierten MIN6-Zellen durchgeführt. Dabei wurden die Zellen mit zwei Fusionsproteinen transfiziert, die beide die Granula markieren sollten, aber unterschiedliche Fluoreszenzsignale produzierten, um sie voneinander unterscheiden zu können. Dabei wurden die Fluoreszenzemissionen in einen Bereich  $< 560$  nm (im Folgenden grüner Bereich genannt) und in einen Bereich  $> 560$  nm (im Folgenden roter Bereich genannt) getrennt. Um diese Untersuchungen zu kalibrieren wurden vorher MIN6-Zellen nur mit dem Fusionsprotein hIns-tDimer transfiziert. Das tDimer wurde mit einer Wellenlänge von 490 nm angeregt und zeigte eine starke Emission im roten Bereich (**Abbildung 4.4A**) und eine schwache Emission im grünen Bereich (**Abbildung 4.4B**). Dabei zeigte sich, dass bei der Trennung der Fluoreszenzemissionen ein leichter Versatz der beiden Bilder entstand (**Abbildung 4.4C**). Der Versatz wurde durch Verschieben des grünen Fluoreszenzbildes um sechs Pixel nach oben und drei Pixel nach rechts korrigiert (**Abbildung 4.4D**). Diese Korrektoreinstellungen wurden für alle weiteren Experimente übernommen.

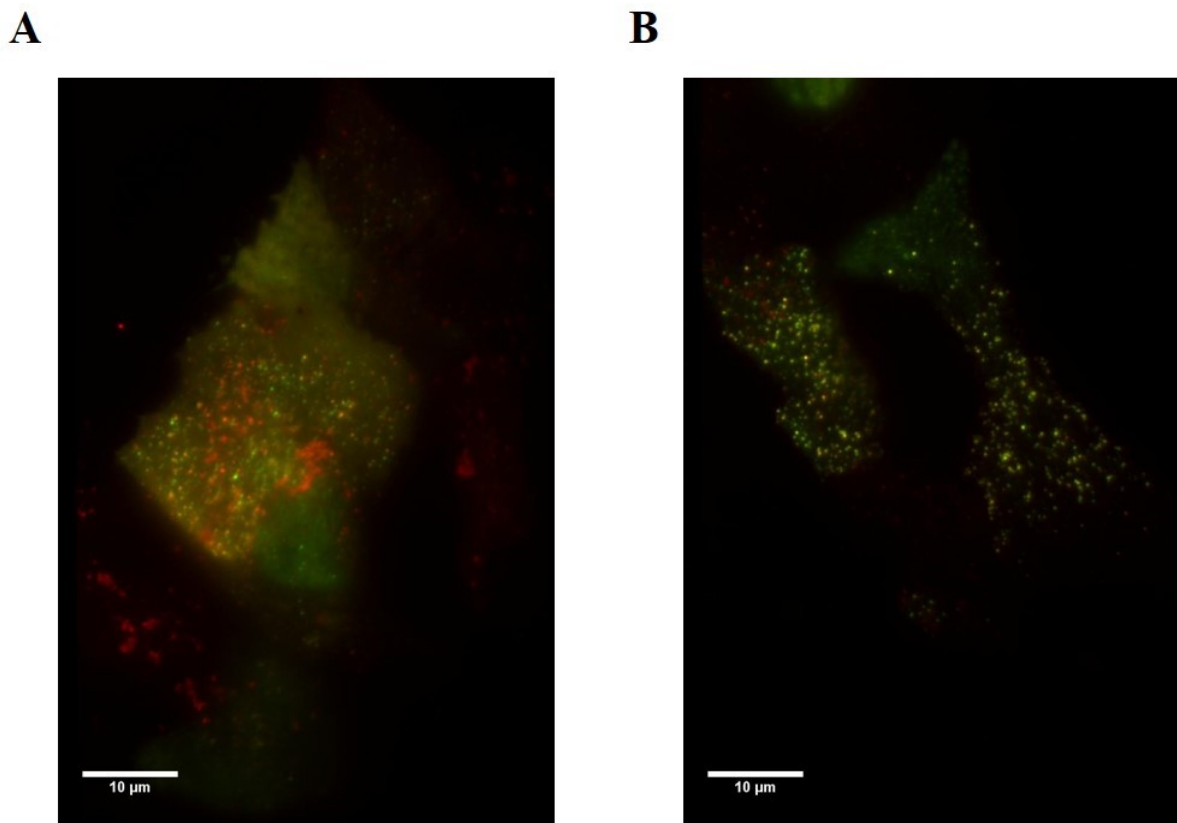
**A****B**

**Abbildung 4.5: Einfluss der Zielstruktur bei der Fluoreszenzmarkierung der Granula**

Bei der Projektion der einzelnen Fluoreszenzbilder aufeinander wurde der Versatz zwischen den beiden Fluoreszenzkanälen korrigiert. Dabei erschienen Granula, die mit beiden Labeln markiert wurden in Gelb. Granula die nur mit einem Label markiert wurden hingegen in Grün oder Rot. (**A**) MIN6-Zellen wurden mit den beiden fluoreszierenden Fusionsproteinen hIns-EGFP und mIns-C-mCherry ko-transfiziert und die beiden Fluoreszenzen aufeinander projiziert. Hier wurden circa zwei Drittel der Granula von beiden Labeln markiert. Die anderen zeigten nur eine Einzelfärbung mit jeweils einem der beiden Label. (**B**) MIN6-Zellen wurden mit den beiden fluoreszierenden Fusionsproteinen hIns-tDimer und mIns-C-emGFP ko-transfiziert und die beiden Fluoreszenzen aufeinander projiziert. In diesem Bild gab es kaum Granula, die mit beiden Labeln markiert wurden. Die roten Granula wirkten dabei unnatürlich groß. Maßstabsbalken = 10 µm



Um den Einfluss der markierten Struktur in den Granula zu untersuchen wurden ko-Transfektionen mit hIns-EGFP und mIns-C-mCherry und mit hIns-tDimer und mIns-C-emGFP durchgeführt (**Abbildung 4.5**). Bei der Markierung mit hIns-EGFP und mIns-C-mCherry zeigten etwa 66% der Granula beide Fluoreszenzsignale, das von EGFP im grünen Bereich und das von mCherry im roten Bereich. In der übereinandergelegten Darstellung beider Fluoreszenzen erschienen diese Granula in Gelb (**Abbildung 4.5A**). Bei der umgekehrten Kombination in der hIns an das rote Fluoreszenzprotein tDimer und mIns-C an das grüne Fluoreszenzprotein emGFP gekoppelt war, zeigte sich eine deutlich geringere Übereinstimmung in den beiden Fluoreszenzbereichen. Dabei fiel auf, dass die mit hIns-tDimer markierten Granula ungewöhnlich groß waren, was ein Hinweis auf den Einfluss des Fluoreszenzproteins beim Markieren der Granula sein könnte (**Abbildung 4.5B**).



**Abbildung 4.6: Einfluss der fluoreszierenden Proteine bei der Fluoreszenzmarkierung der Granula**

Bei der Projektion der einzelnen Fluoreszenzbilder aufeinander wurde der Versatz zwischen den beiden Fluoreszenzkanälen korrigiert, so erschienen Granula, die mit beiden Labeln markiert wurden in Gelb. Granula die nur mit einem Label markiert wurden hingegen in Grün oder Rot. (**A**) MIN6-Zellen wurden mit den beiden fluoreszierenden Fusionsproteinen hIns-EGFP und hIns-tDimer ko-transfiziert und die beiden Fluoreszenzen aufeinander projiziert. Dabei war eine große Diskrepanz zwischen den beiden Markierungen zu erkennen. Wieder führte die Markierung mit hIns-tDimer zur Darstellung unnatürlich groß erscheinender Granula. (**B**) MIN6-Zellen wurden mit den beiden fluoreszierenden Fusionsproteinen mIns-C-emGFP und mIns-C-mCherry ko-transfiziert und die beiden Fluoreszenzen aufeinander projiziert. In diesem Bild gab es eine große Übereinstimmung beider Fluoreszenzlabel. Einfach markierte Granula (Rot oder Grün) waren nur vereinzelt zu beobachten. Maßstabsbalken = 10 µm

Daraufhin wurde der Einfluss des Fluoreszenzproteins getestet, indem solche Fusionsproteine ko-transfiziert wurden, bei denen jeweils verschiedene Fluoreszenzproteine an die gleiche Struktur im Granulum fusioniert wurden. So wurden im nächsten Schritt hIns-EGFP mit hIns-tDimer und mIns-C-emGFP mit mIns-C-mCherry verglichen.

Es zeigte sich eine leicht verbesserte Übereinstimmung der Fluoreszenz von hIns-tDimer mit hIns-EGFP verglichen mit dem mIns-C-emGFP. Allerdings waren erneut sehr große, rote Granula zu sehen, die es im grünen Fluoreszenzbereich nicht gab (**Abbildung 4.6A**).. Die größte Übereinstimmung zeigte sich zwischen den beiden monomeren emGFP und mCherry, die beide an das C-Peptid fusioniert waren, obwohl auch hier die Übereinstimmung nicht vollständig war (**Abbildung 4.6B**). Aufgrund dieser Beobachtungen, wurden zwei Sets von TIRF-Experimenten, jeweils mit den Labeln hIns-EGFP und mIns-C-emGFP durchgeführt.

#### **4.1.3 Messung der Anzahl und Mobilität der Insulin-Granula mittels TIRF-Mikroskopie in einzelnen Beta-Zellen während der Stimulation mit 30 mM Glucose und 40 mM KCl**

Für die TIRF-Experimente wurde das gleiche Versuchsprotokoll verwendet wie für die zuvor durchgeführten Messungen der  $[Ca^{2+}]_i$ . Statt einer kontinuierlichen Messung wurden an repräsentativen Zeitpunkten im Umströmungsprotokoll Sequenzen von 200 Bildern (8 Hz, 25 s) aufgenommen. Dafür gab es mehrere Gründe:

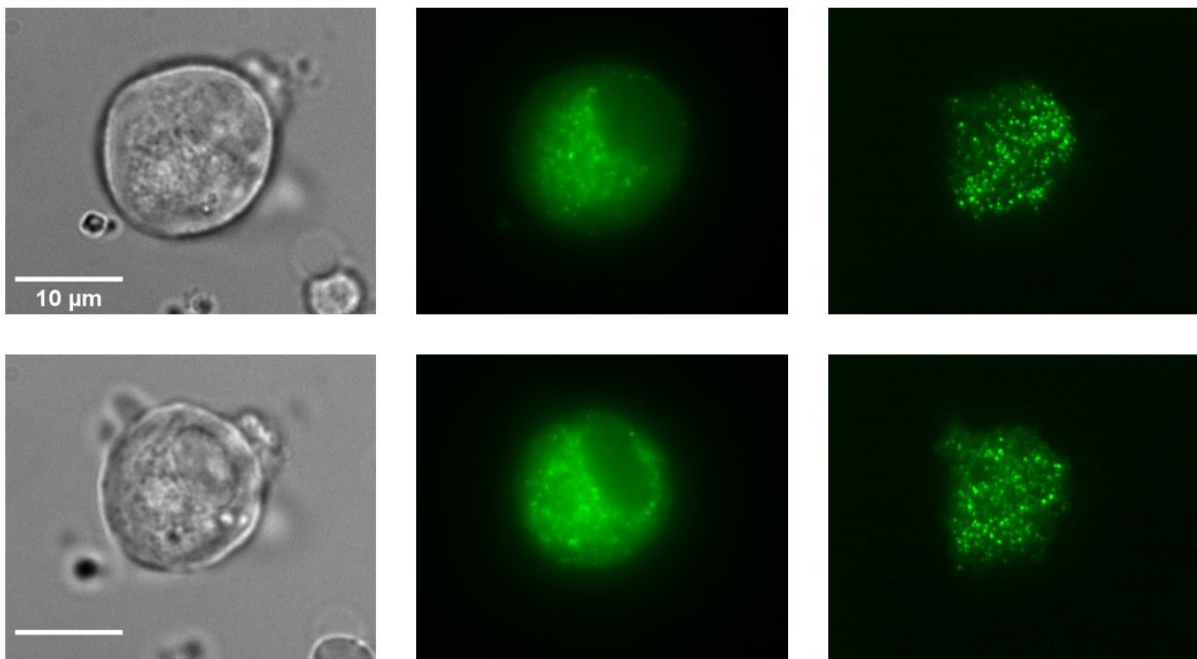
- 1) Eine 50 minütige Messung mit 8 Hz würde eine zu große Datenmenge produzieren.
- 2) Die Photobelastung der Zellen wäre zu stark.
- 3) Mit der gewählten Aufnahmerate waren nur geringe Fehler im Nachverfolgen der Granula möglich (sog. „tracking“), mit einer geringeren Aufnahmerate hätte diese Fehlerrate stark zugenommen (168).

Die so erhaltenen Sequenzen wurden mit einem speziell für diese Versuche entwickelten Programm ausgewertet, das verschiedene Parameter erzeugte, welche Anzahl und Mobilität der Granula beschreiben. (168,169).

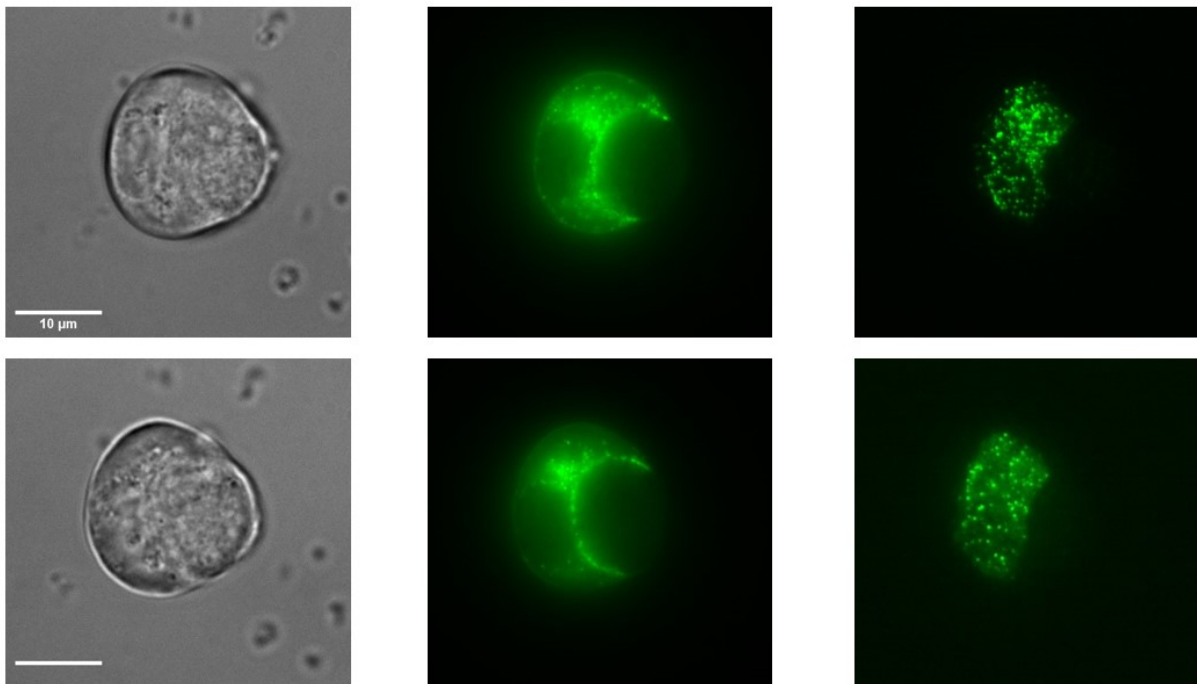
Um einen möglichst vollständigen Überblick über die Zahl und Beweglichkeit der Granula zu erhalten wurden folgende Parameter bestimmt (siehe: Kapitel 3.5.4.1): Die Anzahl der Granula im ersten Bild (Granule Number [First Image]) und die Anzahl der Granula in der gesamten Sequenz (Total Granule Number per Sequence). Außerdem wurden die Granula bestimmt, die weniger als eine Sekunde an der Plasmamembran blieben (Short-term Resident Granules) und

die Granula, die von Anfang an sichtbar waren und über die gesamte Sequenz an der Plasmamembran verblieben (Long-term Resident Granules). Zusätzlich wurden die Granula identifiziert, die von einem Bild zum nächsten an der Plasmamembran auftauchten (Arriving Granules) und wieder verschwanden (Departing Granules). Da die Arriving Granules und die Departing Granules immer gleich groß waren werden hier nur die Arriving Granules gezeigt. Der Parameter Arriving Granules ist außerdem intrinsisch mit den Short-term Resident Granules verbunden, beide zusammen beschreiben die Mobilität der Granula orthogonal zur Plasmamembran (Z-Achse). Zur Beschreibung der Mobilität der Granula parallel zur Plasmamembran (X-Y-Ebene) wurde der Caging Diameter bestimmt. Der Wert jedes Parameters wurde für die erste Sequenz auf 100% normiert, um die Entwicklung der Parameter besser verfolgen und Mittelwerte besser bilden zu können.

**A**



**B**



**Abbildung 4.7: Transduzierte einzelne Beta-Zellen vor und nach einer TIRF-Mikroskopischen Messung (8 Sequenzen)**

(A) Mit hIns-EGFP transduzierte Beta-Zellen. (B) Mit mIns-C-EGFP transduzierte Beta-Zellen. Die oberen Bilder zeigen die Zelle jeweils vor der Messung und die unteren Nachher. Links sind Durchlichtbilder, in der Mitte Epi-Fluoreszenz-Bilder und rechts TIRF-mikroskopische Aufnahmen zu sehen. Maßstabsbalken = 10 µm

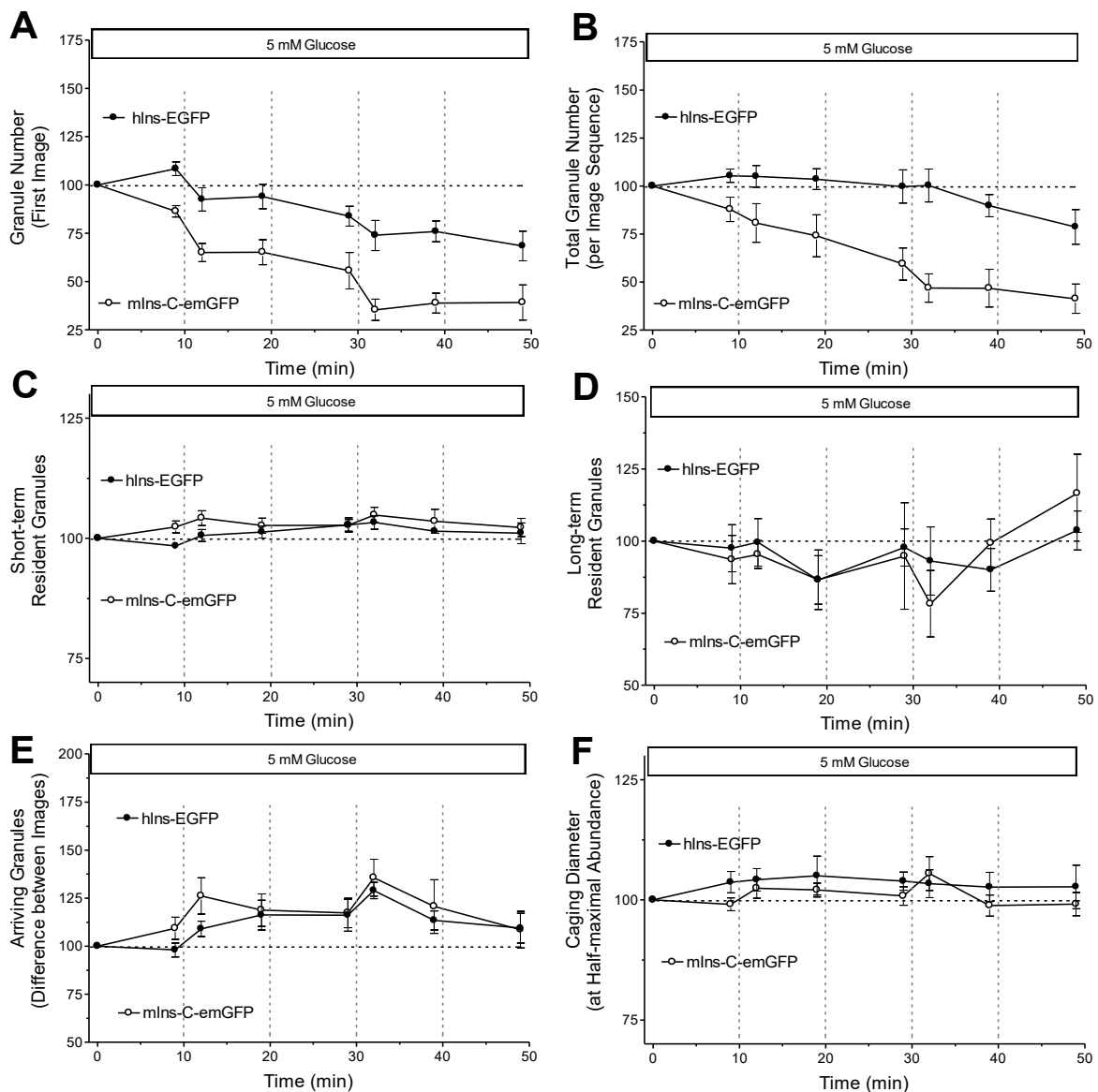
Bei einem generellen Vergleich von hIns-EGFP und mIns-C-emGFP zeigte sich, dass die mit den beiden Fusionsproteinen markierten Granula zunächst optisch nicht voneinander zu unterscheiden waren (**Abbildung 4.7**). Allerdings zeigte sich bei den Granula, die mit mIns-C-emGFP transduziert wurden, ein deutlich stärkeres Ausbleichen der Granula-Fluoreszenz, was auf den Bildern nach den TIRF-Messungen zu erkennen ist. Aus diesem Grund wurde für diese Zellen eine Belichtungsintensität von 30% der maximalen Laserleistung gewählt (**Abbildung 4.7B**). Die Belichtungsintensität der Zellen, die mit hIns-EGFP transduziert wurden, war 50% der maximalen Laserleistung (**Abbildung 4.7A**).

**Tabelle 4.1:** Vergleich typischer Granula-Parameter bei basaler Glucose (5 mM), nach der Transduktion mit hIns-EGFP oder mIns-C-emGFP

Parameter	Beta-Zellen (hIns-EGFP)	Beta-Zellen (mIns-C-emGFP)
<b>Auflagefläche der Zelle</b>	102 ± 13	168 ± 21
<b>Granule Number (First Image)</b>	175 ± 16	201 ± 26
<b>FTotal Granule Number per Sequence</b>	2314 ± 207	2681 ± 269
<b>Turnover</b>	13.4	13.3
<b>Short-Term Resident Granules</b>	1874 ± 176 (79,8 ± 0,8%)	2153 ± 234 (80,3 ± 0,7%)
<b>Long-term Resident Granules</b>	75 ± 11 (43,1 ± 2,2%)	61 ± 14 (31,9 ± 2,7%)
<b>Arriving/Departing Granules (Difference between Images)</b>	6.3 ± 0,3%	7,0 ± 0,4%
<b>Caging Diameter (at Half-Maximal Abundance)</b>	82,5 ± 1,5 nm	85,5 ± 1,5 nm

**Tabelle 4.1** zeigt, dass die Auflagefläche der gemessenen Zellen mit mIns-C-emGFP größer war als die mit hIns-EGFP markierten Zellen. Da aber die Granule Number (First Image) bei beiden gleich groß war, folgte daraus eine höhere Granula-Dichte an der Plasmamembran der Zellen, die mit hIns-EGFP markiert wurden. Dies resultierte aber nicht in einem vermehrten

Austausch der Granula an der Plasmamembran, da der Anteil der Short-term Resident Granules und der Arriving Granules für beide Fusionsproteine gleich war. In beiden Fällen wurde jedes Granulum an der Plasmamembran innerhalb einer Bildsequenz (25 s) 13-mal ausgetauscht, das heißt es hatte von der Plasmamembran ins Zellinnere bewegt und von dort war ein Granulum an die Plasmamembran zurückgekehrt. Auch die Long-term Resident Granules und der Caging Diameter zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden verwendeten Fusionsproteinen.



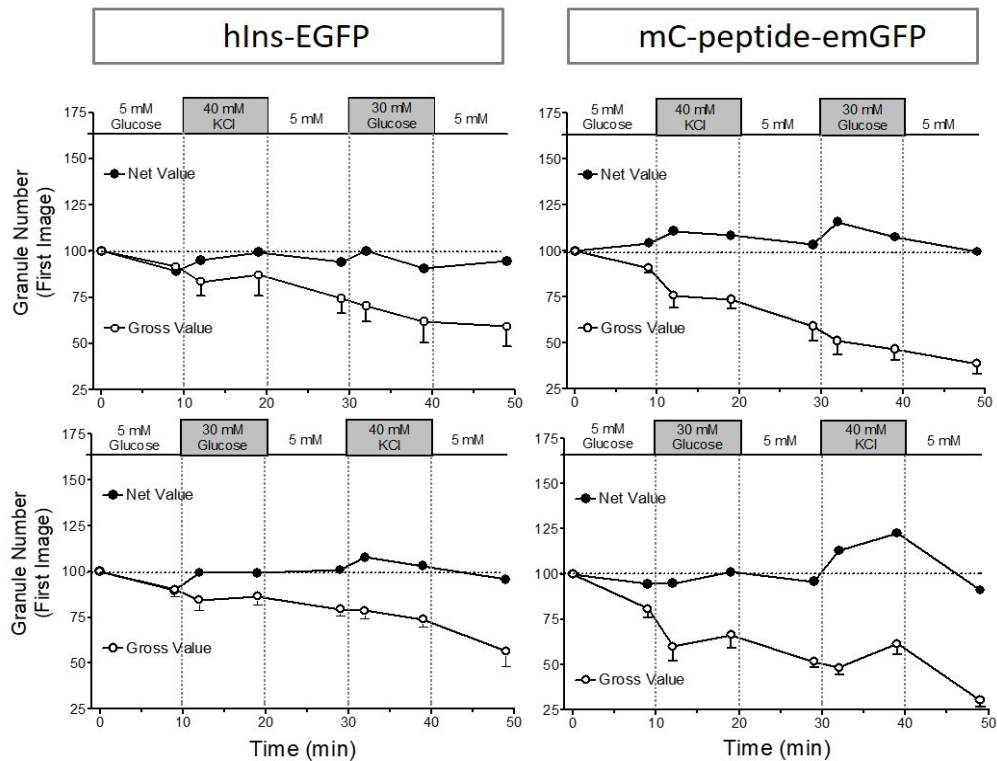
**Abbildung 4.8: Auswirkungen einer 50 minütigen Umströmung mit basaler Glucose (5 mM) auf die Granula im Submembranärraum von viral transduzierten Beta-Zellen**

Die Beta-Zellen wurden entweder mit hIns-EGFP (**geschlossene Kreise**) oder mit mIns-C-emGFP (**offene Kreise**) transduziert. Sie wurden 50 Minuten mit Krebs-Ringer-Lösung mit einer basalen Glucose-Konzentration umströmt. An acht repräsentativen Zeitpunkten wurden Sequenzen von 200 Bildern aufgenommen. Die gemessenen Parameter waren die Anzahl der Granula im ersten Bild (A), die Gesamtzahl der Granula in der

Sequenz (**B**), die Short-term Resident Granules (**C**), die Long-term Resident Granules (**D**), die Arriving Granules (**E**) und der Caging Diameter (**F**). Angegeben ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM von mindestens 5 Messungen.

Zuerst wurden Kontrollversuche durchgeführt, in denen die Zellen durchgehend mit 5 mM Glucose umströmt wurden. Dabei wurde wie in den Versuchen mit den Stimuli alle 10 Minuten das Lösungsreservoir gewechselt. In diesen Messungen war die Granule Number (First Image) der letzten Sequenz für beide Fluoreszenzmarkierungen signifikant reduziert (hIns-EGFP: 68%; mIns-C emGFP: 39%) (**Abbildung 4.8A**). Auch die Total Granule Number per Sequence war reduziert (**Abbildung 4.8B**). Die Arriving Granules und die Short-term Resident Granules zeigten einen schrittweisen reversiblen Anstieg nach dem Wechsel der Lösungsreservoirs (**Abbildung 4.8C + 4.8E**). Auch beim Caging Diameter war dieses Verhalten zu beobachten, allerdings nur beim mIns-C-emGFP (**Abbildung 4.8F**). Die Long-term Resident Granules zeigten keine einheitliche Tendenz (**Abbildung 4.8D**).

Diese Beobachtungen zeigten, dass bereits eine kontinuierliche Perifusion mit basaler Glucose-Konzentration zu einer Veränderung von Zahl und Mobilität der Granula führte. Insofern war es nötig, Nettowerte zu berechnen, um die eigentlichen Stimulationseffekte darzustellen. Für die Berechnung der Nettowerte wurden die Kontrollperfusionen von den Testperfusionen abgezogen. Ein Beispiel für die Bildung der Nettowerte ist in **Abbildung 4.9** dargestellt. In diesem Beispiel wurden die Nettoverläufe der Granule Number (First Image) berechnet und mit den nicht korrigierten Testperfusionen verglichen. Diese Berechnung wurde für beide Arten der Granula-Markierung und beide Reihenfolgen der Stimulation durchgeführt.



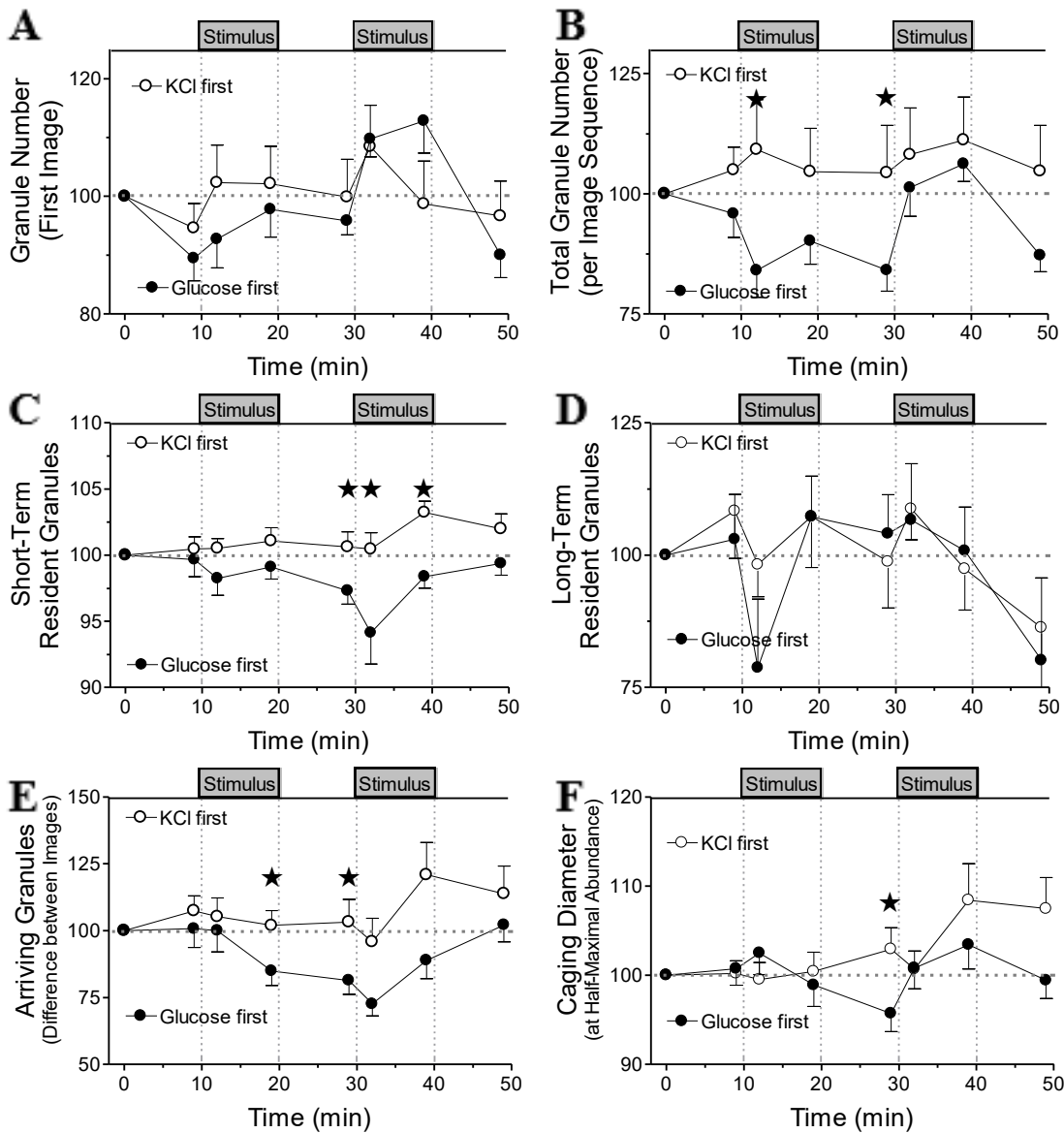
**Abbildung 4.9: Berechnung der Nettowerte am Beispiel der Granula im ersten Bild**

Die Beta-Zellen wurden entweder mit hIns-EGFP (**Diagramme links**) oder mit mIns-C-emGFP (**Diagramme rechts**) transduziert. Sie wurden während des Versuchs 50 Minuten mit Krebs-Ringer-Lösung umströmt. Von Minute 10 – 20 wurde die Konzentration der Kalium-Ionen auf 40 mM erhöht und die Glucose-Konzentration wurde von Minute 30 – 40 auf 30 mM erhöht (**Diagramme oben**). Die Stimuli wurden auch in umgekehrter Reihenfolge verwendet (**Diagramme unten**). Dabei wurden an acht repräsentativen Zeitpunkten Sequenzen von 200 Bildern aufgenommen. In den Diagrammen ist der Mittelwert der Testmessungen (**Offene Kreise**) und die berechneten Nettowerte (**Geschlossene Kreise**) zu sehen. Für die Berechnung der Nettowerte wurden die Kontrollperfusionen von den Testperfusionen abgezogen. Die Testmessungen sind jeweils als Mittelwert - SEM von mindestens 4 Versuchen angegeben.

In Zellen, die mit hIns-EGFP markiert wurden, hatten weder 30 mM Glucose noch 40 mM KCl einen Einfluss auf die Granule Number (First Image) (**Abbildung 4.9 links**). Das galt unabhängig von der Reihenfolge, in der die Stimuli verwendet wurden. Die mit mIns-C-emGFP markierten Zellen zeigten generell ein sehr ähnliches Bild, obwohl jeweils eine leichte Erhöhung der Granula-Zahl zu erkennen war. Das galt speziell für die Stimulation mit 40 mM KCl (**Abbildung 4.9 rechts**).



Da die Ergebnisse der Nettowerte beider Granula-Markierungen einen qualitativ gleichartigen Verlauf zeigten, wurden die Mittelwerte der Nettowerte aus beiden Granula-Markierungen für alle Parameter berechnet.



**Abbildung 4.10: Mittelwerte aus den Nettowerten, der mit hIns-EGFP oder mIns-C-emGFP transduzierten Zellen**

Die Beta-Zellen wurden 50 Minuten mit Krebs-Ringer-Lösung umströmt. Von Minute 10 – 20 wurde die Konzentration der Kalium-Ionen auf 40 mM erhöht und die Glucose-Konzentration wurde von Minute 30 – 40 auf 30 mM erhöht (**offene Kreise**). Die Stimuli wurden auch in umgekehrter Reihenfolge verwendet (**geschlossene Kreise**). An acht repräsentativen Zeitpunkten wurden Sequenzen von 200 Bildern aufgenommen. Die gemessenen Parameter waren die Anzahl der Granula im ersten Bild (**A**), die Gesamtzahl der Granula in der Sequenz (**B**), die Short-term Resident Granules (**C**), die Long-term Resident Granules (**D**), die Arriving Granules (**E**) und der Caging Diameter (**F**). Angegeben ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM aus den beiden Nettowerten von hIns-EGFP und mIns-C-emGFP. Signifikante Unterschiede sind mit einem „Stern“ markiert.

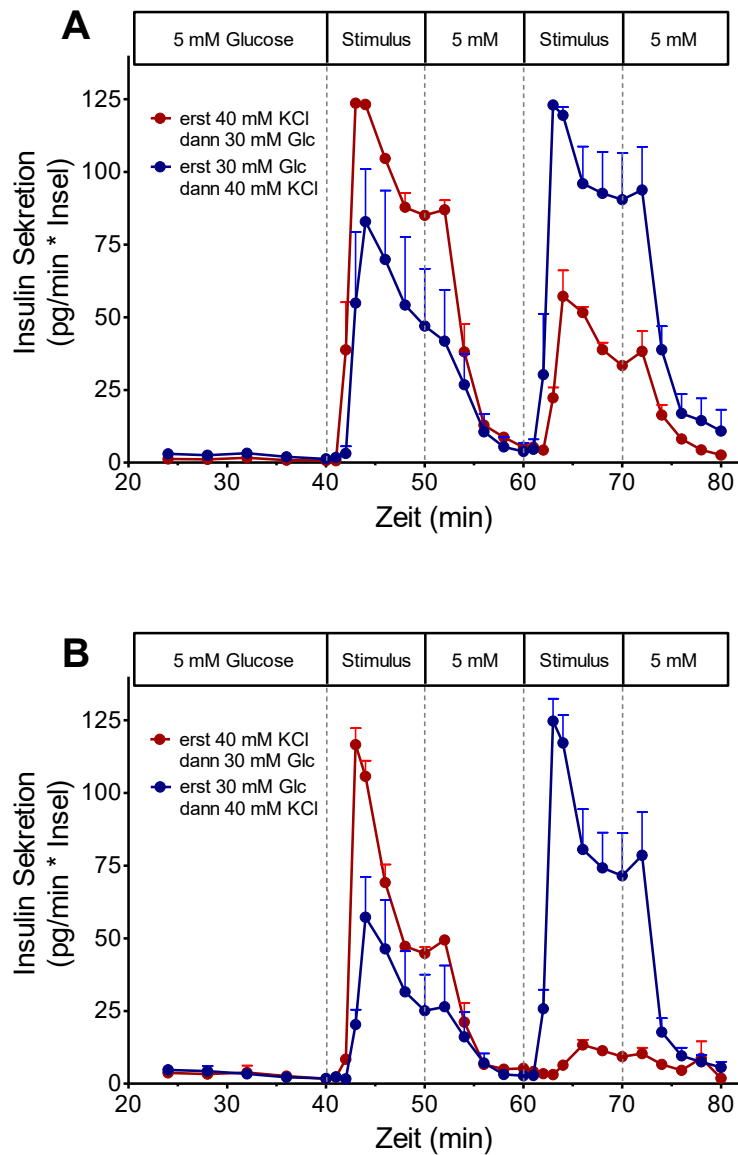
In dieser Darstellung wurden die Effekte beider Stimuli auf das Verhalten der Granula direkt miteinander verglichen. Die offenen Kreise zeigen die Parameter der Granula, wenn erst mit 40 mM KCl und dann mit 30 mM Glucose stimuliert wurde und die geschlossenen Kreise die umgekehrte Reihenfolge. Für die Granule Number (First Image) zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Stimuli (**Abbildung 4.10A**). Das gleiche gilt für die Long-term Resident Granules, die außerdem eine sehr große Streuung in den Messwerten zeigten (**Abbildung 4.10D**). Die Parameter, die die Beweglichkeit der Granula in Z-Richtung beschreiben (Total Granule Number per Sequence, Arriving Granules, Short-term Resident Granules) zeigten einen konsistenten Verlauf. Während 30 mM Glucose als erster Stimulus zu einer Verringerung dieser Parameter führte, hatte 40 mM KCl als erster Stimulus keinen Effekt. Daraus ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen KCl und Glucose, der sich bis in die Auswaschphase des ersten Stimulus fortsetzte, da der Einfluss der Glucose so lange nachwirkte. Bei Betrachtung der zweiten Stimulation führten beide Stimuli zu einer Erhöhung der drei Mobilitätsparameter (**Abbildung 4.10B + 4.10C + 4.10E**). Auch der Caging Diameter, der die Mobilität in der X-Y-Ebene beschreibt zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen KCl und Glucose als ersten Stimulus. Dieser entwickelte sich allerdings erst verzögert in der Auswaschphase. Der zweite Stimulus führte auch hier zu einem Anstieg der Mobilität mit beiden Stimuli (**Abbildung 4.10F**).

In allen Experimenten kam es insgesamt zu 36 Exozytose-Ereignissen. Von diesen 36 Exozytosen wurden 20 Exozytosen in Zellen registriert, die mit hIns-EGFP transduziert waren. Diese 20 Exozytosen verteilten sich auf neun Zellen. Die restlichen 16 Exozytosen wurden in Zellen registriert, die mit mIns-C-emGFP transduziert waren. Diese 16 Exozytosen verteilten sich auf sechs Zellen. Es gab keine erhöhte Rate von Exozytose-Ereignissen während der Phasen der Stimulation.

#### **4.1.4 Messung der Insulinsekretion primärer Inseln aus NMRI-Mäusen während der Stimulation mit 30 mM Glucose und 40 mM KCl**

Um zu prüfen wie weit sich das Exozytose-Verhalten und insbesondere der Unterschied zwischen Glucose Stimulation und KCl-Depolarisation im tatsächlichen Sekretionsverhalten von Inseln widerspiegelt, wurden NMRI-Maus-Inseln in Perifusionsversuchen eingesetzt. Wie auch bei den Inseln, die zur Isolierung von einzelnen Beta-Zellen verwendet wurden waren die NMRI-Mäuse 12-14 Wochen alt. Es wurde das gleiche Perfusionsprotokoll verwendet wie für die  $\text{Ca}^{2+}$ - und TIRF-Messungen. Die Sekretion wurde sowohl bei 37 °C als auch bei 32 °C

gemessen um zu zeigen, dass die Daten der TIRF-Experimente und der Messungen der  $[Ca^{2+}]_i$ , die bei 32 °C an Einzelzellen entstanden, physiologisch relevant sind.



**Abbildung 4.11: Insulinsekretion nach einer Erhöhung von KCl auf 40 mM oder einer Erhöhung der Glucose-Konzentration auf 30 mM bei 32 °C oder 37 °C**

Je 50 Inseln aus NMRI-Mäusen wurden 80 Minuten lang mit Krebs-Ringer-Lösung umströmt. Von Minute 40 – 50 wurde die Konzentration der Kalium-Ionen auf 40 mM erhöht und die Glucose-Konzentration wurde von Minute 60 – 70 auf 30 mM erhöht (**Rot**). Die Stimuli wurden auch in umgekehrter Reihenfolge eingesetzt (**Blau**). Die Versuche wurden sowohl bei 37 °C (**A**) als auch bei 32 °C (**B**) durchgeführt. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte + SEM aus 3 Umströmungen.

Bei 37 °C führte der Einsatz von 40 mM KCl zu einem schnellen und starken Anstieg der Insulinsekretion, die während der darauf folgenden Auswaschphase wieder auf das basale Sekretionslevel zurückging. Die Sekretionsantwort auf die danach eingesetzten 30 mM Glucose entsprach 43 % (AUC) der vorangegangenen Kaliumdepolarisation. Wurde Glucose als erster Stimulus verwendet, entsprach die Sekretionsantwort 56 % des nachfolgenden KCl-Stimulus. Die Sekretionsantwort auf einen KCl-Stimulus war unabhängig von der Reihenfolge der Stimuli (**Abbildung 4.11A**). Bei 32 °C entsprach der Verlauf der Sekretionskurven qualitativ dem bei 37 °C. Die Sekretion war bei 32 °C generell verringert, das galt im Besonderen für den Glucose-Stimulus. Am stärksten war dieser Effekt, wenn der Glucose-Stimulus auf die Kaliumdepolarisation folgte. So entsprach bei 37 °C die Sekretionsantwort auf den Glucose-Stimulus nach der Kaliumdepolarisation 74 % der Sekretion durch Glucose als erster Stimulus und bei 32 °C lag dieser Wert nur noch bei 37 %. Die Effektivität des KCl-Stimulus war bei 32°C nahezu unverändert. Der erste Sekretionsanstieg erfolgte wie bei 37 °C, aber es kam daraufhin zu einem etwas schnelleren Abfall der Sekretionsraten (**Abbildung 4.11B**).

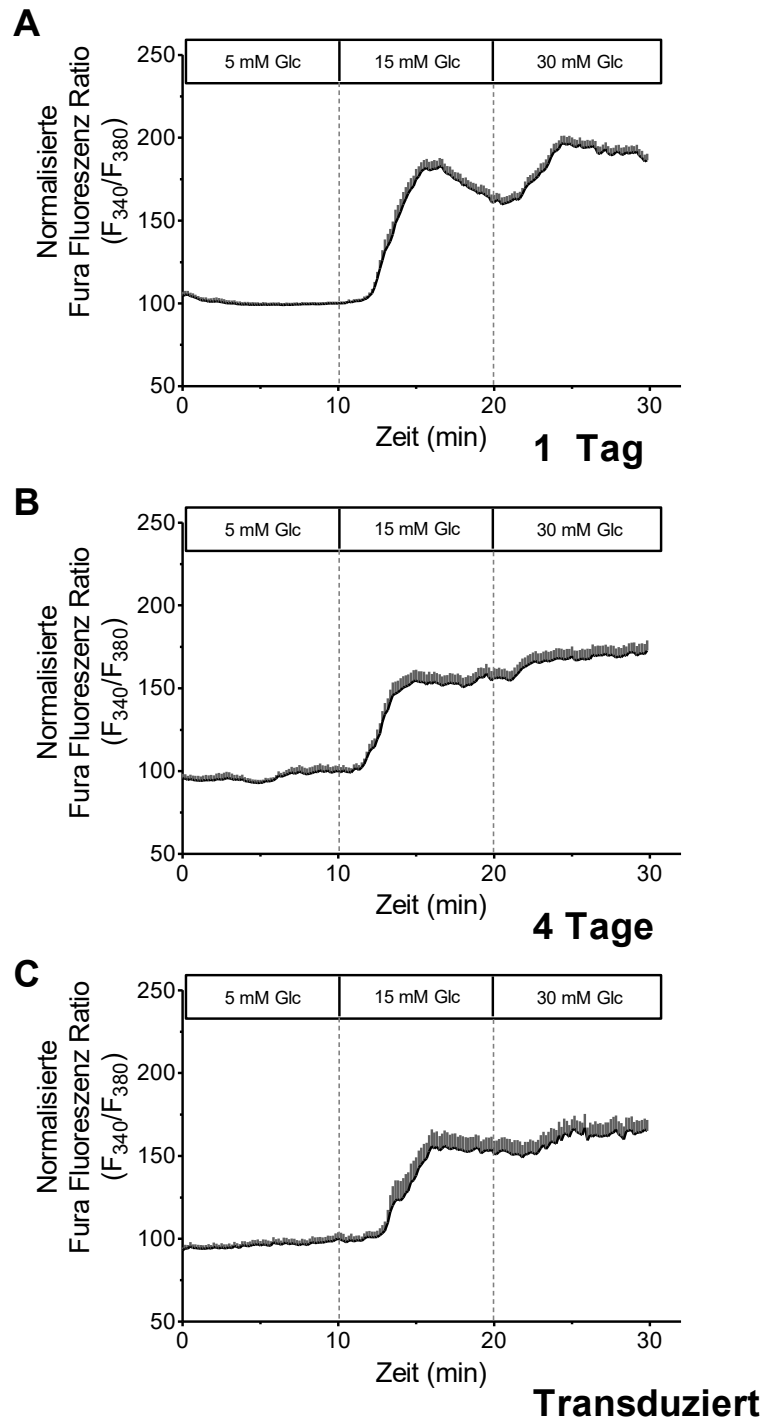
## **4.2 Vergleich der Wirkung eines maximal effektiven Glucose-Stimulus mit einem physiologischen Glucose-Stimulus auf Insulin-Granula und das Aktin-Zytoskelett**

Im ersten Abschnitt wurde ein maximal effektiver Nährstoffstimulus (30 mM Glucose) mit einer maximal effektiven Kaliumdepolarisation (40 mM KCl) verglichen. Im nächsten Abschnitt soll gezeigt werden inwiefern die Beobachtungen bei Stimulationen mit 30 mM Glucose auch bei physiologischen, stimulierenden Konzentrationen von 15 mM Glucose zu beobachten sind. Dieses Protokoll wurde auch verwendet, um stimulationsbedingte Änderungen im Aktin-Zytoskelett zu beobachten.

Die Experimente an einzelnen Beta-Zellen wurden auch in dieser Versuchsreihe bei 32 °C durchgeführt. Die Zellen wurden 70 Minuten lang umströmt. Davon entfielen 40 Minuten auf die Vorlaufphase, in der sich die zuvor in Kultur befindlichen Zellen in der Umströmung stabilisieren konnten und 30 Minuten auf das eigentliche Experiment. In den Experimenten wurden die Zellen in den ersten 10 Minuten mit einer basalen Glucose-Konzentration von 5 mM umströmt. Diese wurde nach 10 Minuten auf 15 mM Glucose und nach weiteren 10 Minuten auf 30 mM Glucose erhöht.

### **4.2.1 Messung der Cytosolischen Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in einzelnen Beta-Zellen während der Stimulation mit 15 mM und 30 mM Glucose**

Die  $[Ca^{2+}]_i$  wurde mit dem Farbstoff Fura2-AM LeakRes gemessen und als Fura Fluoreszenz Ratio angegeben. Für diese Versuche wurde das zuvor beschriebene Umströmungsprotokoll (siehe: Kapitel 4.2) verwendet. Die  $[Ca^{2+}]_i$  wurde an einzelnen Beta-Zellen sowohl nach einem Tag Zellkultur als auch nach vier Tagen Zellkultur gemessen. Außerdem wurde der Verlauf der  $[Ca^{2+}]_i$  an, mit hIns-EGFP und tagRFP-T-Lifeact7 viral ko-transduzierten Zellen gemessen, die aufgrund der Transduktion ebenfalls 4 Tage in der Zellkultur verbrachten. Diese Experimente dienten unter anderem als Funktionskontrollen für die nachfolgenden TIRF-mikroskopischen Untersuchungen der Insulin-Granula und des Aktin-Zytoskeletts.



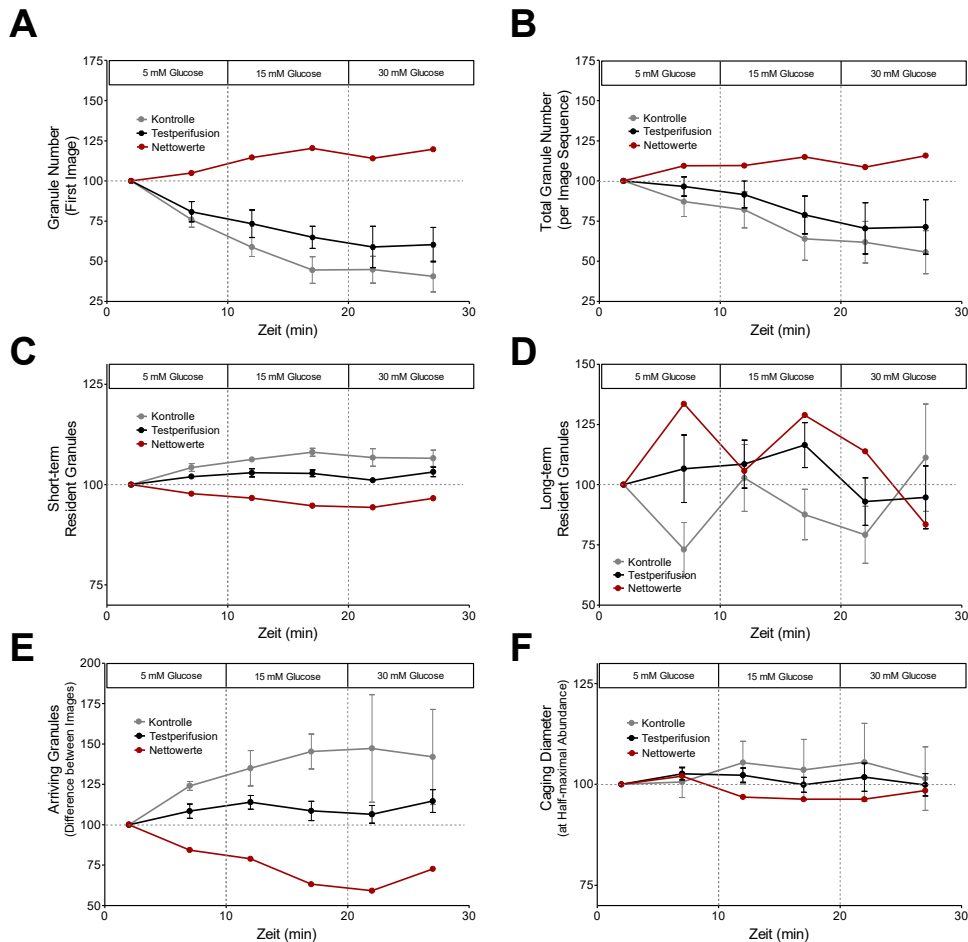
**Abbildung 4.12: Einfluss schrittweise steigender Glucose-Konzentrationen auf die  $[Ca^{2+}]_i$  von Beta-Zellen**

Die Beta-Zellen wurden 30 Minuten lang mit Krebs-Ringer-Lösung umströmt. Von Minute 10 – 20 wurde die Glucose-Konzentration auf 15 mM erhöht und von Minute 20 – 30 weiter auf 30 mM. Die Messungen wurden nach einem Tag Zellkultur (**A**) und nach vier Tagen Zellkultur (**B**, **C**) durchgeführt. Die Messungen nach vier Tagen Zellkultur erfolgten an nicht-transduzierten Zellen (**B**) und an Zellen, die mit hIns-EGFP und tagRFP-T-Lifeact7 ko-transduziert wurden (**C**). Die Kurven wurden zu Minute 10 auf den Wert 100 normalisiert, um die drei Kurven besser vergleichen zu können (Verhältnis der jeweiligen Anstiege durch die Stimuli). Angegeben sind jeweils die Mittelwerte + SEM aus 2 (**A**), 3 (**C**) oder 6 (**B**) Versuchen.

Nach einem Tag in der Zellkultur führten 15 mM Glucose zu einer Steigerung der Fura-Ratio um etwa 80 %. Danach sank die  $[Ca^{2+}]_i$  während der fortgesetzten Stimulation mit 15 mM Glucose um ca. 20 %. Durch die Umströmung mit 30 mM Glucose stieg die  $[Ca^{2+}]_i$  wieder an, erreichte allerdings nur geringfügig höhere Spitzenwerte als mit 15 mM Glucose (**Abbildung 4.12A**). Nach vier Tagen Zellkultur sah der Verlauf der  $[Ca^{2+}]_i$ , unabhängig von der Transduktion, fast so aus wie nach einem Tag Zellkultur. Dennoch gab es leichte Unterschiede. Wie zuvor schon zu beobachten war, konnten die Stimuli die  $[Ca^{2+}]_i$  nicht in dem Maße steigern wie nach nur einem Tag in der Zellkultur. So stieg die Fura-Ratio durch die Stimulation mit 15 mM Glucose nur um 60 %. Allerdings sank die  $[Ca^{2+}]_i$  während der Stimulation mit 15 mM Glucose nach dem ersten Anstieg nicht wieder ab (**Abbildung 4.12B + 4.12C**).

#### **4.2.2 Messung von Anzahl und Mobilität der Insulin-Granula mittels TIRF-Mikroskopie in einzelnen Beta-Zellen während der Stimulation mit 15 mM und 30 mM Glucose**

Es wurde das gleiche Umströmungsprotokoll verwendet, wie zuvor die Messung der  $[Ca^{2+}]_i$ . Auch hier wurden Bildersequenzen an repräsentativen Zeitpunkten aufgenommen, die in gleicher Weise wie zuvor dargestellt ausgewertet wurden (siehe: Kapitel 4.1.3). Es hat sich in den vergangenen Versuchen gezeigt, dass es zu einer reversiblen stufenweisen Veränderung einiger Parameter kam, wenn zwei Sequenzen kurz nacheinander aufgenommen wurden. Die Zeitpunkte für die Aufnahme der Sequenzen wurden deshalb diesmal so gewählt, dass der Abstand zwischen ihnen immer gleich war. Wie auch in den vorangegangenen Messungen der Insulin-Granula wurden auch hier Nettowerte berechnet, um den Effekt der Stimulation von Änderungen des Hintergrundes abzuheben (siehe: Kapitel 4.1.3).



**Abbildung 4.13: Anzahl und Mobilität submembranärer Granula unter Einfluss schrittweise steigender Glucose-Konzentrationen**

Die Beta-Zellen wurden mit hIns-EGFP transduziert. Dargestellt sind die Ergebnisse der Test-Perfusionen (**Schwarze Linie**), die Ergebnisse der Kontroll-Perfusionen (**Graue Linie**), in denen durchgehend mit 5 mM Glucose umströmt wurde, und die daraus berechneten Nettowerte (**Rote Linie**). In den Testbedingungen wurden die Zellen 30 Minuten mit Krebs-Ringer-Lösung umströmt. Von Minute 10 – 20 wurde die Glucose-Konzentration von 5 mM auf 15 mM erhöht. Von Minute 20 – 30 wurde die Glucose-Konzentration weiter auf 30 mM erhöht. An sechs repräsentativen Zeitpunkten wurden Sequenzen von 200 Bildern aufgenommen. Die gemessenen Parameter waren die Anzahl der Granula im ersten Bild (**A**), die Gesamtzahl der Granula in der Sequenz (**B**), die Short-term Resident Granules (**C**), die Long-term Resident Granules (**D**), die Arriving Granules (**E**) und der Caging Diameter (**F**). Angegeben ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM von 4 (Kontroll-Perfusionen) oder 5 (Test-Perfusionen) Versuchen.

In **Abbildung 4.13** sind sowohl die Werte für die kontinuierliche Umströmung mit 5 mM Glucose, als auch die Werte für die Effekte der Steigerung der Glucose Konzentration von 5 auf 15 und schließlich auf 30 mM dargestellt. Die daraus berechneten Nettowerte sind in Rot hervorgehoben. Die Nettowerte der Granule Number (First Image) und der Total Granule Number per Sequence stiegen zu Beginn der Messung leicht an und blieben erhöht. Allerdings ist zu sehen, dass der Unterschied zwischen den Testperfusionen und den Kontrollen nicht

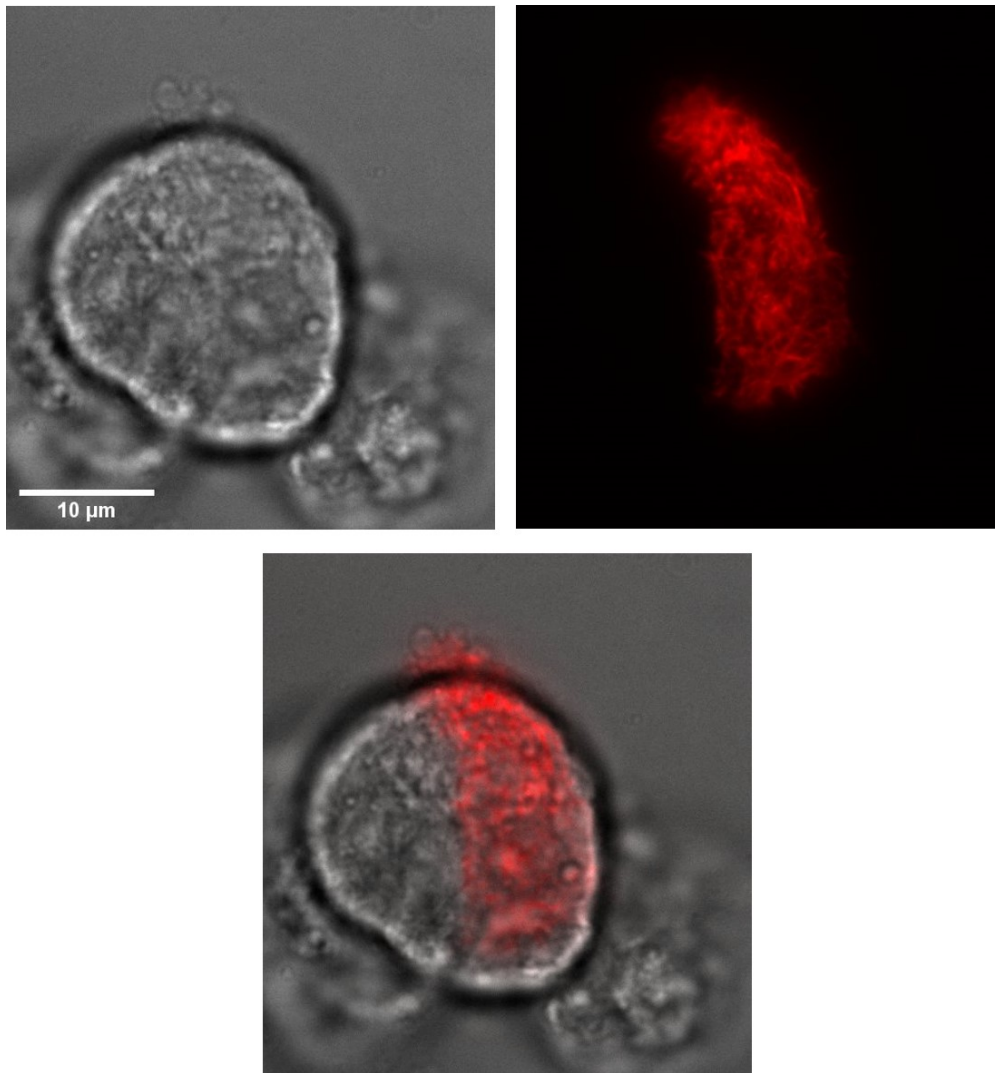


signifikant war (**Abbildung 4.13A + 4.13B**). Die Nettowerte der Short-term Resident Granules und der Arriving Granules sanken durch die Stimulation mit Glucose, wie zuvor schon zu beobachten war (siehe: Kapitel 4.3.1). Für diese Parameter war der Unterschied zwischen den Testperfusionen und den Kontrollen signifikant. Es war bemerkenswert, dass dieser Effekt bereits mit 15 mM Glucose vollständig zu sehen war und bei 30 mM Glucose sogar etwas zurückging (**Abbildung 4.13C + 4.13E**). Der Nettowert des Caging Diameters sank auch leicht, allerdings war auch für diesen Parameter der Unterschied zwischen Testperfusion und Kontrolle nicht signifikant (**Abbildung 4.13F**). Wie auch in den vorangegangenen Versuchen zeigten die Long-term Resident Granules keine einheitliche Tendenz (**Abbildung 4.13D**).

#### 4.2.3 Parallele Fluoreszenzmarkierung der Insulin-Granula und des Aktin-Zytoskeletts

Sowohl in Sekretionsexperimenten (185–187), als auch in TIRF-mikroskopischen Untersuchungen (187), wurde bereits gezeigt, dass das Aktin-Zytoskelett einen Einfluss auf die Insulinsekretion beziehungsweise die Freisetzung des Insulins aus den Granula hat. Diese Untersuchungen wurden meist mit F-Aktin stabilisierenden Toxinen wie Jaspakinolide (185–187) oder mit F-Aktin destabilisierenden Toxinen wie Latrunculin oder Cytochalasin (185–187) durchgeführt. Deshalb wurde das Aktin-Zytoskelett sowohl unter dem Einfluss stimulierender Glucose-Konzentrationen als auch unter dem Einfluss des Toxins Latrunculin beobachtet. Das Aktin wurde mit dem fluoreszierenden Fusionsprotein mtagRFP-T-Lifeact7 markiert, das für life cell imaging geeignet ist, da es die Funktionen des Aktins praktisch nicht beeinflusst.

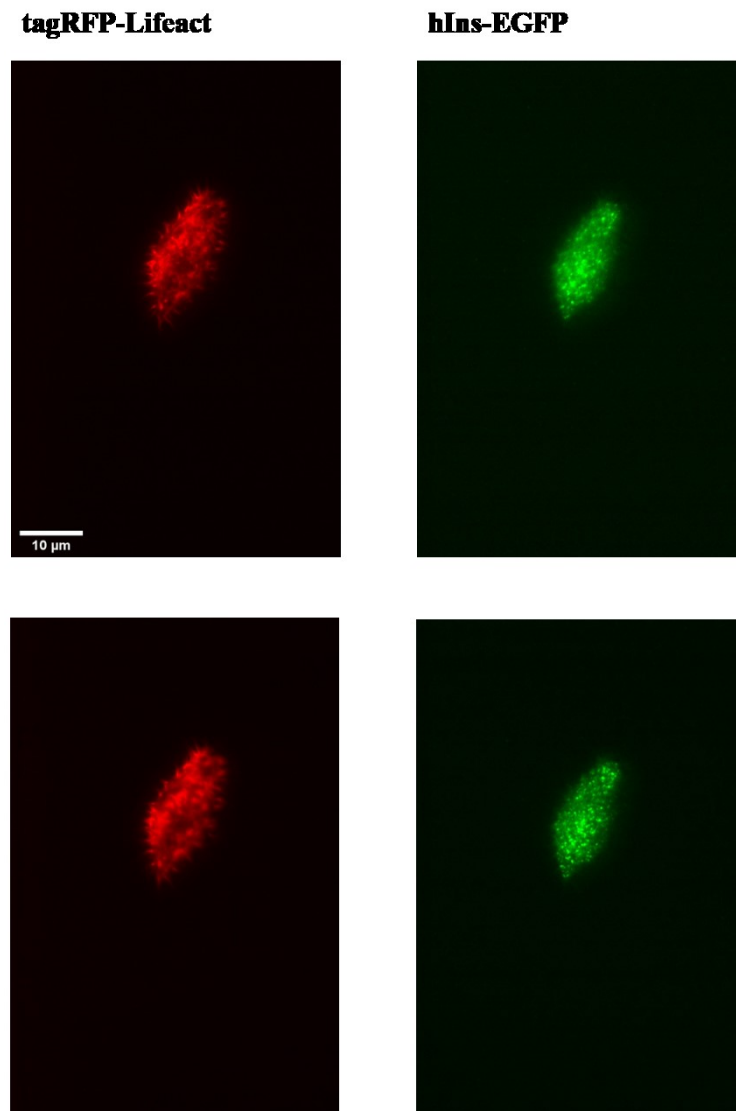
Zunächst wurde nur das Aktin-Zytoskelett der Zellen allein markiert. Dies gelang mittels viraler Transduktion der Beta-Zellen. Zu sehen ist das Aktin-Zytoskelett einer Zelle eines mehrzelligen Clusters, das sich als ein dichtes Netzwerk von Aktin-Filamenten darstellte. Im Durchlichtbild ist zunächst eine vermeintlich gut abgegrenzte runde Form des Zellclusters zu sehen. Projiziert man allerdings die Aktin-Fluoreszenz auf das Durchlichtbild, ist zu erkennen, dass die Aktin-Fluoreszenz auch außerhalb dieser „Zellgrenze“ zu sehen ist. Diese Strukturen sind meist Filopodia, die ausgebildet werden, damit sich die Zellen an der Glasoberfläche anhaften können (**Abbildung 4.14**).



**Abbildung 4.14: Mit tagRFP-T-Lifeact7 transduzierter Beta-Zellcluster (2 - 3 Zellen)**

Beta-Zellcluster, der mit tagRFP-T-Lifeact7 transduziert wurde. Eine der Zellen im Cluster hat dabei die DNA aufgenommen. Dargestellt ist ein Durchlichtbild des Clusters (**oben links**), das Fluoreszenzbild des gefärbten Aktins (**oben rechts**) und eine Projektion der Fluoreszenz auf das Durchlichtbild (**unten**). Maßstabsbalken = 10 µm

Für die gemeinsame Darstellung der Insulin-Granula und des Aktin-Zytoskeletts wurden die vorbereiteten Beta-Zellen mit zwei Viren ko-transduziert. Da die Transduktionseffizienz der Viren bei ca. 10 % lag, war es nicht einfach, solche Zellen zu finden, die beide Fusionsproteine exprimierten. Dabei war es von Vorteil, wenn die Fluoreszenz-Intensitäten beider Fluorophore in etwa gleich groß waren. Zunächst wurde mit diesen Zellen die Lagebeziehung der Insulin-Granula und des Aktin-Zytoskeletts untersucht.

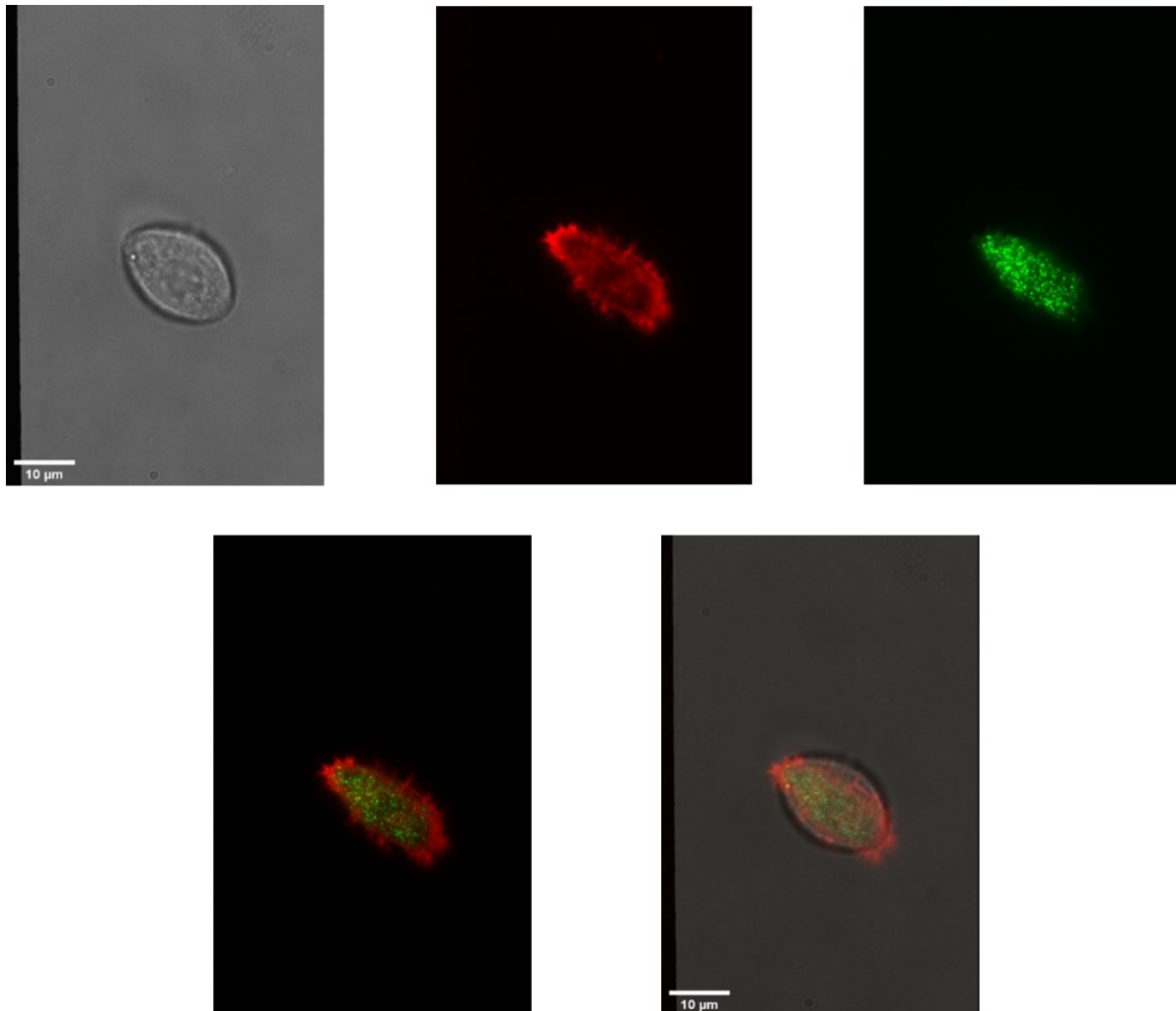


**Abbildung 4.15:** Mit hIns-EGFP und tagRFP-T-Lifeact7 ko-transduzierte einzelne Beta-Zelle

Einzelzelle, die mit hIns-EGFP (**rechts**) und tagRFP-T-Lifeact7 (**links**) ko-transduziert wurde. Für die parallele Detektion wurde das Fluoreszenzlicht in zwei Kanäle aufgetrennt. Die Darstellung des Aktins erfolgte im roten Kanal und die der Granula im grünen Kanal. Es konnte nur eine der beiden Fluoreszenzen zugleich scharf dargestellt werden. Wurde die Aktin-Fluoreszenz scharf dargestellt, war die Granula-Fluoreszenz unscharf (**oben**). Allerdings fiel auf, dass eine minimale Höhenverstellung des Objektivs ausreichend war um die Granula scharf zu fokussieren. Dabei wurde allerdings die Darstellung des Aktins unschärfer (**unten**). Maßstabsbalken = 10 µm

**Abbildung 4.15** zeigt, dass die beiden Strukturen (Aktin und Granula) unterschiedliche Abstände von der Plasmamembran hatten, da es im TIRF-Modus, nur möglich war eine der beiden Strukturen scharf dazustellen. Durch geringgradige Höhenverstellung des Objektivs war die jeweils andere Markierung scharf darstellbar.

Es schien außerdem von Bedeutung für die Struktur des Aktin-Netzwerks und für die Verteilung der Insulin-Granula zu sein, ob die ko-transduzierte Zelle als Einzelzelle vorlag oder eine Zelle innerhalb eines Zellclusters war.

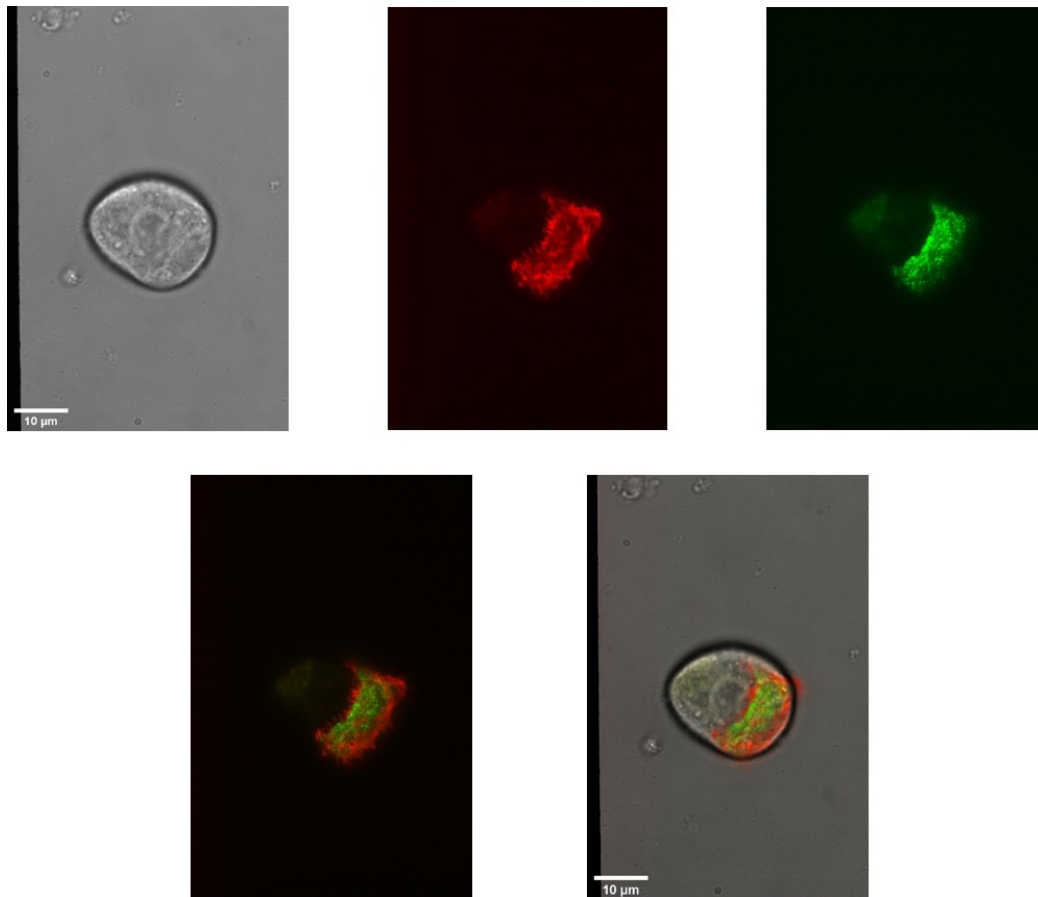


**Abbildung 4.16: Verteilung des Aktin-Zytoskeletts und der Insulin-Granula in einer einzelnen Beta-Zelle**

Viral ko-transduzierte einzelne Beta-Zelle. Für die parallele Detektion wurde das Fluoreszenzlicht in zwei Kanäle aufgetrennt. Die Darstellung des Aktins erfolgte im roten Kanal und die der Granula im grünen Kanal. Dargestellt sind Durchlicht (**oben links**), Aktin-Fluoreszenz (**oben Mitte**), Granula-Fluoreszenz (**oben rechts**), die Projektion der beiden Fluoreszenzen aufeinander (**unten links**) und die Projektion der Fluoreszenzen auf das Durchlichtbild (**unten**). Maßstabsbalken = 10 µm

Bei der Betrachtung der Einzelzellen in der Epifluoreszenz war eine Art Grenze um die Zelle herum zu beobachten, die sich durch eine starke Aktin-Fluoreszenz auszeichnete. Diese wurde bereits in der Literatur beschrieben und als „Aktin-Wall“ bezeichnet (188). Die beobachtete Fluoreszenz der Insulin-Granula lag ausschließlich innerhalb dieses Aktin-Walls. Das war zu erkennen, nachdem die Granula-Fluoreszenz auf die Aktin-Fluoreszenz projiziert wurde. Eine solche Verteilung war auch in den TIRF-mikroskopischen Bildern zu beobachten. Bei der Projektion beider Fluoreszenzen auf das Durchlichtbild war zu erkennen, dass sich die Granula im TIRF-Feld innerhalb der Zellgrenzen des Durchlichtbilds befanden. Die Zellgrenzen im Durchlichtbild reichten in dieser Darstellung deutlich über die Grenzen des sog. „footprints“ im TIRF-Modus hinaus. Dieser Unterschied war wahrscheinlich dadurch bedingt, dass die Zellmembran nur im zentralen Anteil der Zelle dicht genug an der Glasoberfläche lag, um im TIRF-Feld angeregt zu werden. Im Gegensatz zur Fluoreszenz der Insulin-Granula war die Aktin-Fluoreszenz auch außerhalb der Zellgrenzen des Durchlichtbilds zu finden. Es zeigten sich hier fingerförmige Fortsätze, die als Filopodia bezeichnet werden. Zudem war die Differenz zwischen den Durchlicht-Zellgrenzen und den im TIRF-Modus abschätzbaren Zellgrenzen deutlich geringer als bei Betrachtung der Insulin-Granula (s.o.), was zur Annahme passt, dass das Aktin-Zytoskelett näher an der Plasmamembran lokalisiert ist (**Abbildung 4.16**).

Bei Betrachtung von doppelt transduzierten Zellen innerhalb eines Zellclusters fiel wiederholt auf, dass Granula und Aktin unterschiedlich innerhalb der Zelle verteilt waren. So wirkte die Aktin-Fluoreszenz auf der rechten Seite der Zelle deutlich kompakter, während die Granula-Fluoreszenz auf der linken Seite intensiver wirkte. Dies wurde besonders deutlich, wenn beide Fluoreszenzen aufeinander projiziert wurden. Bei der Projektion beider Fluoreszenzbilder auf das Durchlichtbild zeigte sich, dass die Aktin-Fluoreszenz an der Kontaktfläche zum umströmenden Medium besonders deutlich war, während die Granula-Fluoreszenz vor allem am Zell-Zell-Kontakt innerhalb des Clusters zu beobachten war (**Abbildung 4.17**).

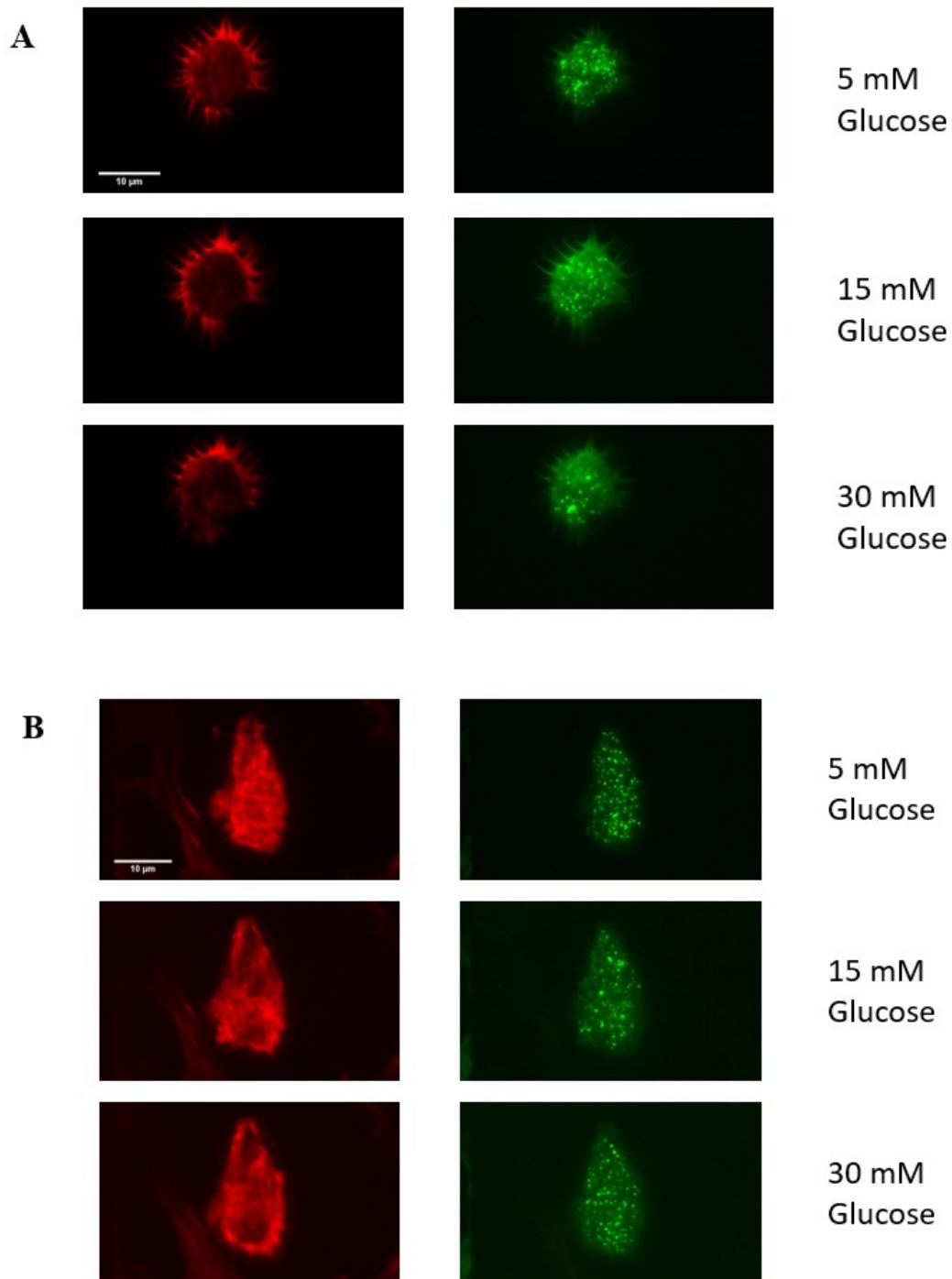


**Abbildung 4.17: Verteilung des Aktin-Zytoskeletts und der Insulin-Granula in einer Beta-Zelle innerhalb eines Zellclusters**

Viral ko-transduzierte Beta-Zelle innerhalb eines Zellclusters. Für die parallele Detektion wurde das Fluoreszenzlicht in zwei Kanäle aufgetrennt. Die Darstellung des Aktins erfolgte im roten Kanal und die der Granula im grünen Kanal. Dargestellt sind Durchlicht (**oben links**), Aktin-Fluoreszenz (**oben Mitte**), Granula-Fluoreszenz (**oben rechts**), die Projektion der beiden Fluoreszenzen aufeinander (**unten links**) und die Projektion der Fluoreszenzen auf das Durchlichtbild (**unten rechts**). Maßstabsbalken = 10 µm

#### **4.2.4 Parallele Darstellung der Struktur und der Dynamik des Aktin-Zytoskeletts und der Insulin-Granula mittel TIRF-Mikroskopie in einzelnen Beta-Zellen während der Stimulation mit 15 mM und 30 mM Glucose**

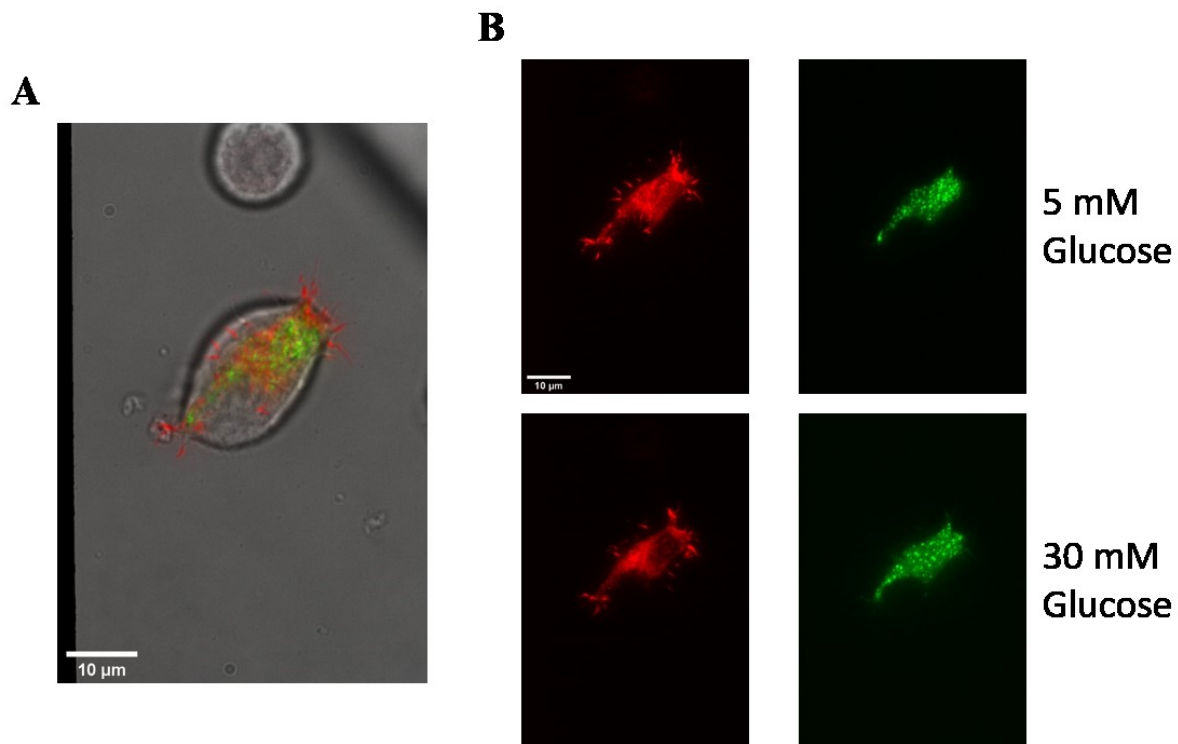
Auch doppelt transduzierte Beta-Zellen wurden mit dem oben genannten Protokoll (Glucose: 5 mM → 15 mM → 30 mM) umströmt. Hier war das Ziel eine quantifizierbare Beziehung zwischen den Insulin-Granula und dem Aktin zu etablieren, die sich mit dem Einsatz einer Glucose-Stimulation ändert. Das Hauptproblem dabei war die Heterogenität der Aktin-Strukturen in den einzelnen Beta-Zellen.



**Abbildung 4.18: Heterogenität des Aktin-Zytoskeletts in einzelnen, doppelt transduzierten Beta-Zellen**

In (A) und (B) ist jeweils eine Beta-Zelle dargestellt, die mit tagRFP-T-Lifeact7 (**links**) und hIns-EGFP (**rechts**) ko-transduziert wurde. Für die parallele Detektion wurde das Fluoreszenzlicht in zwei Kanäle aufgetrennt. Die Darstellung des Aktins erfolgte im roten Kanal und die der Granula im grünen Kanal. Die Aufnahmen wurden jeweils in Gegenwart von 5 mM Glucose (**oben**), 15 mM Glucose (**Mitte**) und 30 mM Glucose (**unten**) gemacht. Maßstabsbalken = 10  $\mu\text{m}$

Um diese Heterogenität beispielhaft darzustellen, wurden zwei Zellen miteinander verglichen. Die obere Zelle hatte einen Ring aus Filopodia-Strukturen, der sich um die gesamte Zelle verteilte (**Abbildung 4.18A**), der bei der unteren Zelle nicht zu sehen war. Dafür erschien das Aktin-Netzwerk in der unteren Zelle deutlich dichter (**Abbildung 4.18B**). Es gab allerdings auch Gemeinsamkeiten zwischen den beiden Zellen. Zum einen zeigten beide Zellen Lücken in der Aktin-Struktur und zum anderen lockerte sich die Aktin-Struktur bei steigender Glucose-Konzentration auf. Zudem zeigte sich in einigen Zellen eine klar sichtbare Ungleichverteilung von Aktin und Granula beim Einsatz stimulatorischer Glucose-Konzentrationen.



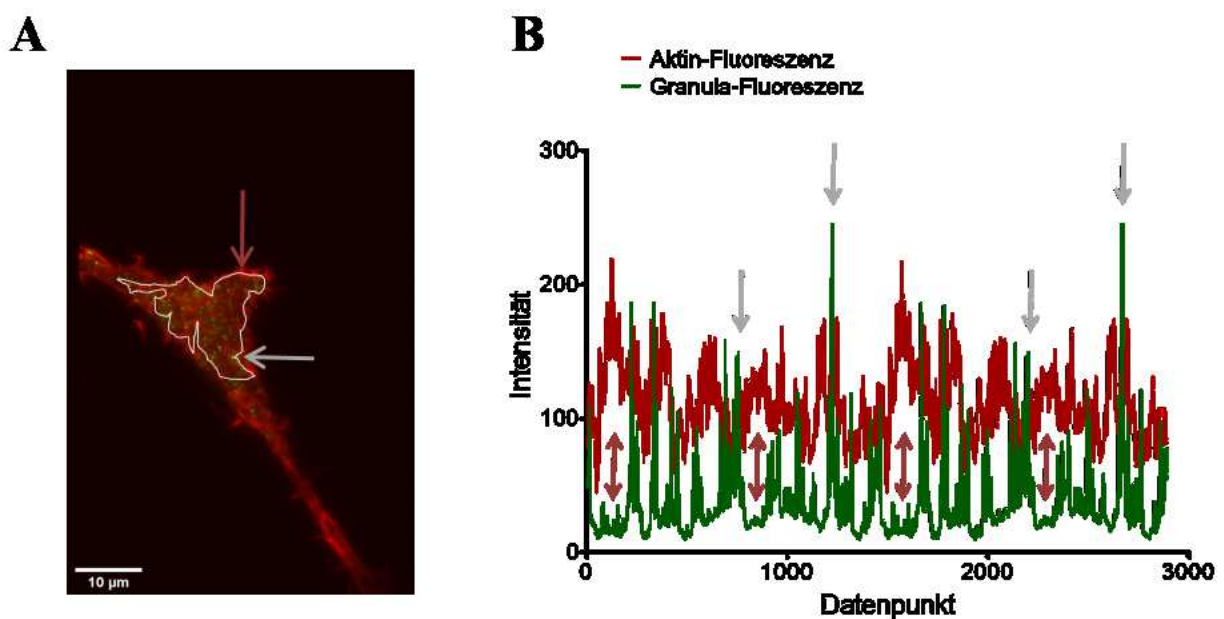
**Abbildung 4.19: Lokalisation der submembranären Granula und des kortikalen Aktins unter basalen Bedingungen und während der stimulation mit 30 mM Glucose**

Viral ko-transduzierte einzelne Beta-Zelle. Für die parallele Detektion wurde das Fluoreszenzlicht in zwei Kanäle aufgetrennt. Die Darstellung des Aktins erfolgte im roten Kanal und die der Granula im grünen Kanal. (A) Projektion der Aktin- und der Granula-Fluoreszenz auf das Durchlichtbild der Zelle. (B) Darstellung der Aktin-Fluoreszenz (links) und der Granula-Fluoreszenz (rechts) in Gegenwart von 5 mM Glucose (oben) und 30 mM Glucose (unten). In Gegenwart von 5mM Glucose sind sowohl das kortikale Aktin als auch die submembranären Granula in der Zelle weitgehend gleichverteilt. Nach dem Einwirken des 30 mM Glucose-Stimulus war zu erkennen, dass die Aktin-Dichte im Zentrum der Zelle zu- und am rechten Rand der Zelle abnahm. Umgekehrt nahm die Granula-Dichte am rechten Rand der Zelle zu und nahm im Zentrum ab. Maßstabsbalken = 10 µm

In der hier dargestellten Zelle waren Aktin und Granula bei basaler Glucose-Konzentration annähernd gleichmäßig verteilt (**Abbildung 4.19A**). Stieg die Glucose-Konzentration erst auf 15 mM und dann auf 30 mM an so entwickelte sich eine Ungleichverteilung beider



Fluoreszenzen. Die Dichte der Aktin-Fasern nahm in der Mitte der Zelle zu und am rechten Rand deutlich ab, während umgekehrt gegen Ende die Granula-Dichte rechts höher war als in der Mitte der Zelle (**Abbildung 4.19B**). Es sollte nun ein Ansatz beschrieben werden, um eine solche Entwicklung in einen Zahlenwert zu kondensieren und sie so zu quantifizieren. Die Idee war, dass es durch die Stimulation mit Glucose zu einer veränderten Lokalisation des kortikalen Aktins und der submembranären Insulin-Granula innerhalb der Zelle kommt, was zu einer stärkeren räumlichen Trennung der entsprechenden Fluoreszenzsignale führen müsste. Das würde zum, in der Literatur beschriebenen „Aktin-Remodelling“ durch einen Glucose-Stimulus passen (189).



**Abbildung 4.20: Lokalisation der submembranären Insulin-Granula im kortikalen Aktin-Netzwerk bei basaler Glucose-Konzentration (5 mM)**

Viral ko-transduzierte einzelne Beta-Zelle. Für die parallele Detektion wurde das Fluoreszenzlicht in zwei Kanäle aufgetrennt. Die Darstellung des Aktins erfolgte im roten Kanal und die der Granula im grünen Kanal. (A) Projektion der Aktin- und der Granula-Fluoreszenz aufeinander. (B) Intensitätsdiagramm der Aktin-Fluoreszenz und der Granula-Fluoreszenz in Gegenwart von 5 mM Glucose. Das Diagramm bezieht sich auf die weiße Linie im Bild (A). Hohe Granula-Fluoreszenz korrelierte mit geringer Aktin-Fluoreszenz (**Graue Pfeile**) und umgekehrt (**Braune Pfeile**). Die einzige quantitative Beschreibung der Aktin-Dichte, die es aufgrund der Betrachtung der Fluoreszenz bisher gibt, ist die des Aktin-Randwalls der in der Epi-Fluoreszenz zu beobachten ist (190). Eine genauere quantitative Beschreibung des kortikalen Aktins im TIRF-Modus ist daher wünschenswert. Maßstabsbalken = 10 µm

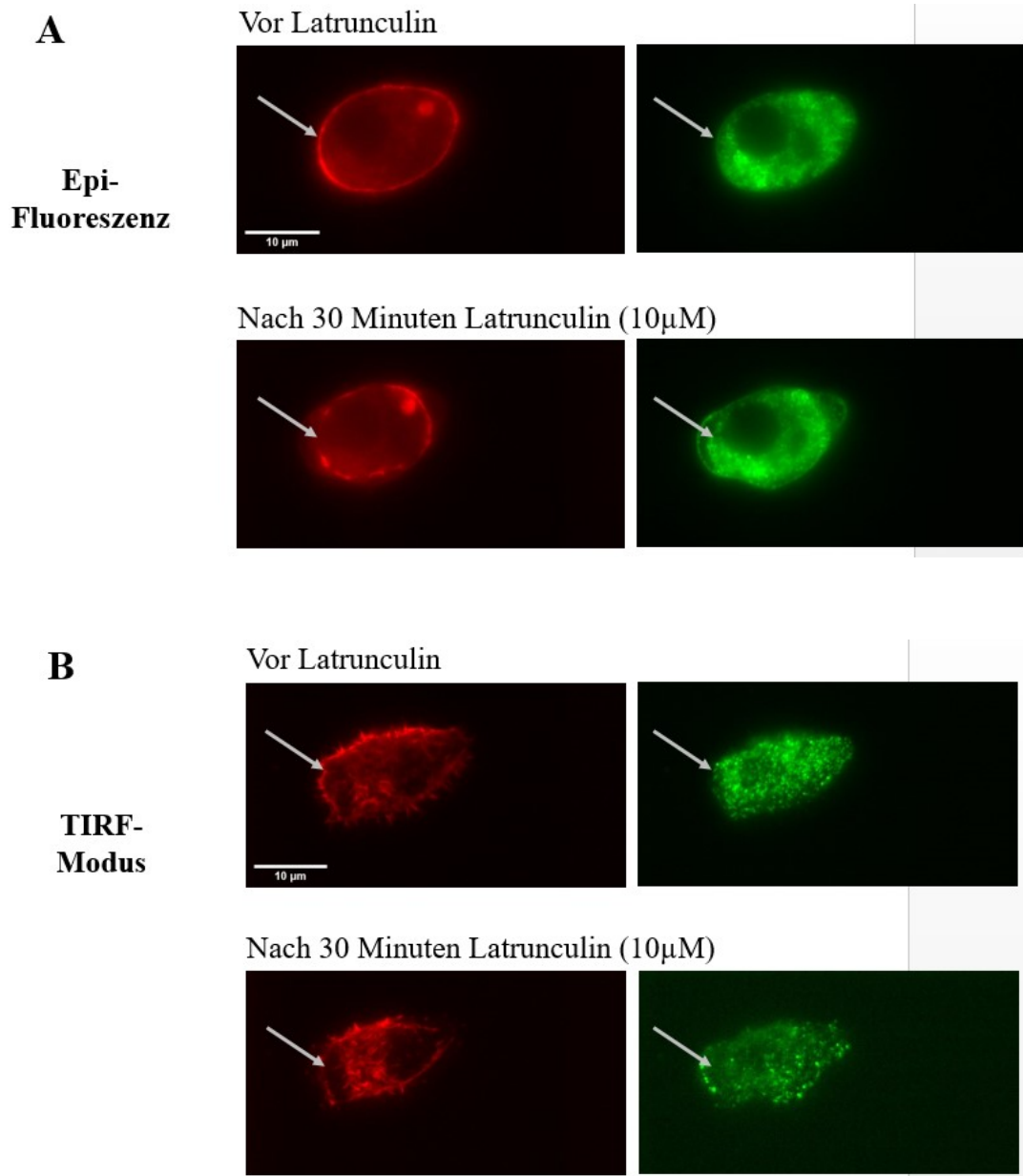
Mit Hilfe dieser etwas ungewöhnlich geformten Betazelle sollte dieser Ansatz nun erklärt werden. Es wurden zunächst die Fluoreszenzbilder von Aktin und Granula aufeinander projiziert. Die Granula schienen sich dabei in den freien Flächen zwischen den Aktin-Strukturen anzuordnen (**Abbildung 4.20A**). Ein Diagramm, das durch die weiße Linie im

Fluoreszenzbild repräsentiert wird und den Verlauf beider Fluoreszenz-Intensitäten zeigt, sollte das verdeutlichen. Die orangenen Pfeile zeigen Bereiche mit hoher Aktin-Fluoreszenz und geringer Granula-Fluoreszenz und umgekehrt zeigen die grauen Pfeile Bereiche mit niedriger Aktin-Fluoreszenz und hoher Granula-Fluoreszenz (**Abbildung 4.20B**).

Um diese gegenläufige Beziehung mit einem Zahlenwert beschreiben zu können, wurden zunächst die Mittelwerte der beiden Intensitätsverläufe, die in **Abbildung 4.20B** gezeigt werden, berechnet. Als nächstes wurde von jedem Punkt dieser Intensitätsverläufe die Differenz zum jeweiligen Mittelwert bestimmt, um zu sehen wo sich überdurchschnittlich hohe (positive Werte) oder niedrige (negative Werte) Fluoreszenzintensitäten befanden. Dies wurde sowohl für die Granula-Fluoreszenz als auch für die Aktin-Fluoreszenz durchgeführt. Diese relativen Intensitätsverläufe wurden dann an jedem Punkt miteinander multipliziert und dann invertiert (mit -1 multipliziert). Dabei sollten durch die Inversion besonders hohe positive Werte entstehen, wenn es an einem Punkt eine überdurchschnittlich hohe Aktin-Fluoreszenz und eine unterdurchschnittliche Granula-Fluoreszenz gab oder umgekehrt. Zuletzt wurde wieder ein Durchschnittswert aus dem gesamten Verlauf berechnet. Dieser sollte dann steigen, wenn es, zum Beispiel durch einen Glucose-Stimulus, vermehrt zu einer Entfernung der Granula- und Aktin-Fluoreszenzen voneinander kommt. Der hier beschriebene Wert zeigte allerdings kein einheitliches Verhalten nach der Verwendung stimulatorischer Glucose-Konzentrationen.

#### **4.2.5 Vergleich eines Glucose-Stimulus mit dem Effekt von Latrunculin B auf die Struktur und die Dynamik von Aktin**

Wir wollten nun die Wirkung des Glucose-Stimulus mit einem Stoff vergleichen, von dem bekannt war, dass er einen starken Effekt auf das Aktin-Zytoskelett hat, welcher zudem auch mit der Erhöhung der Insulinsekretion korreliert (191). Wir entschieden uns im Folgenden Latrunculin B als Positivkontrolle zu verwenden und den Latrunculin-Effekt mit dem des Glucose-Stimulus zu vergleichen. Zunächst wurde der alleinige Effekt des Latrunculin B auf das kortikale Aktin-Zytoskelett und auf die submembranären Granula untersucht.



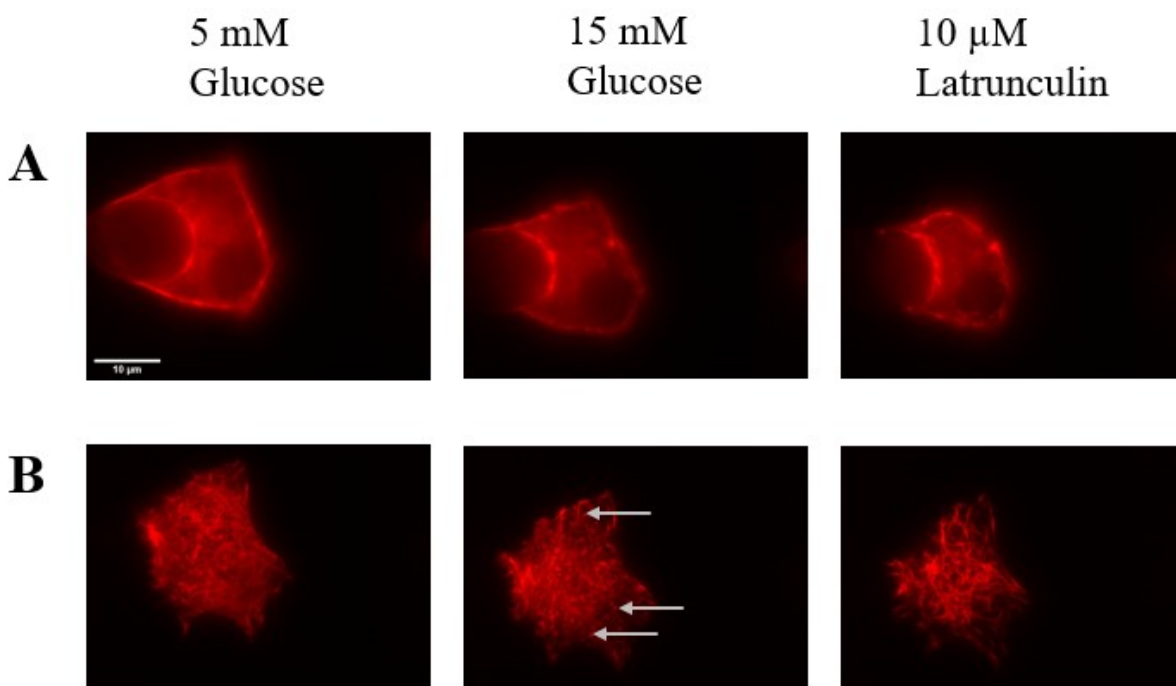
**Abbildung 4.21: Wirkung von Latrunculin auf Aktin-Zytoskelett und Insulin-Granula**

Viral ko-transduzierte einzelne Beta-Zelle. Für die parallele Detektion wurde das Fluoreszenzlicht in zwei Kanäle aufgetrennt. Die Darstellung des Aktins erfolgte im roten Kanal und die der Granula im grünen Kanal. Darstellung der Epi-Fluoreszenz (**A**) und der TIRF-Fluoreszenz (**B**). Es wurde jeweils die Aktin-Fluoreszenz (**links**) und die Granula-Fluoreszenz (**rechts**) separat betrachtet. Die Bilder zeigen die Situation vor Zugabe von Latrunculin (**oben**) und nach 30 minütiger Umströmung mit 10 µM Latrunculin (**unten**). Der graue Pfeil markiert in jedem Bild jeweils den Ort an dem der Aktin Randwall ist, beziehungsweise nach der Umströmung mit Latrunculin war. Es zeigte sich bei genauer Betrachtung vor allem, dass die Granula-Fluoreszenz nach der Umströmung mit Latrunculin nicht mehr durch den Aktin-Wall begrenzt war. Maßstabsbalken = 10 µm

Zu sehen ist eine einzelne Beta-Zelle, die mit tagRFP-T-Lifeact7 (**links**) und hIns-EGFP (**rechts**) ko-transduziert wurde. In der Epifluoreszenz war vor dem Einsatz des Latrunculins im roten Fluoreszenzbereich ein Aktin-Wall zu sehen, der am Rand und die Zelle herum lokalisiert war. Im Zellinneren war eine weitgehend strukturlose homogene Rotfluoreszenz erkennbar. Die

Insulin-Granula befanden sich vollständig innerhalb des Aktin-Randwalls. Nach 30 minütiger Umströmung mit 10  $\mu$ M Latrunculin hatte dieser Wall deutliche Lücken. An diesen Stellen war dann auch die grüne Fluoreszenz der Granula außerhalb des vormals intakten Walls zu erkennen (**Abb. 4.21A**). Das Muster des Aktins in den TIRF-Aufnahmen war deutlich komplexer, ein durchgehender Randwall war nicht erkennbar. Aber auch hier konnte ein Abbau des Aktins festgestellt werden. Besonders bemerkenswert war, dass an der Stelle, an der in den Epifluoreszenz Aufnahmen die grüne Fluoreszenz außerhalb des Aktin-Walls zu sehen war, nun besonders helle Granula im TIRF-Bild zu sehen waren (**Abb. 4.21B**).

Nach der generellen Beschreibung der Effekte des Latrunculins wurde der Einfluss von Latrunculin auf das Aktin-Zytoskelett mit dem von 15 mM Glucose verglichen. Es wurden 15 mM Glucose als Stimulus gewählt, da diese im Vorfeld (siehe: Kapitel 4.2.3) die größte Wirkung auf die Insulin-Granula zeigten.



**Abbildung 4.22: Latrunculin-Wirkung auf das Aktin-Zytoskelett im Vergleich mit einem 15 mM Glucose-Stimulus**

Viral ko-transduzierte einzelne Beta-Zelle. Für die parallele Detektion wurde das Fluoreszenzlicht in zwei Kanäle aufgetrennt. Die Darstellung des Aktins erfolgte im roten Kanal und die der Granula im grünen Kanal. Hier ist nur die Aktin-Fluoreszenz gezeigt. Darstellung der Epi-Fluoreszenz (**A**) und der Bilder im TIRF-Modus (**B**) in der Gegenwart von 5 mM Glucose (**links**) und nach 30 minütiger Umströmung mit erst 15 mM Glucose (**Mitte**) und dann 10  $\mu$ M Latrunculin (**rechts**). Sowohl Glucose als auch Latrunculin hatten einen Einfluss auf den Aktin-Randwall in der Epi-Fluoreszenz und schienen die Form der Zelle zu beeinflussen. Im TIRF-Modus war mit 15 mM Glucose ein Abbau des Aktin-Netzwerks zu beobachten. Dabei entstanden punktförmige Strukturen (**graue Pfeile**). Nach dem Einsatz von Latrunculin war nur noch eine grobe Struktur aus dicken Aktin-Fasern zu sehen. Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m

Die Zelle wurde mit tagRFP-T-Lifeact7 und hIns-EGFP ko-transduziert, in der Abbildung ist allerdings nur das Aktin-Zytoskelett dargestellt. In der Epifluoreszenz war unter basalen Bedingungen wieder ein Aktin-Wall zu erkennen. Dieser wurde unter dem jeweils 30 minütigen Einfluss von 15 mM Glucose und 10  $\mu$ M Latrunculin immer weiter abgebaut. Latrunculin führte neben einem weiteren Abbau des Randwalls auch zu einer stärkeren Formveränderung der Zelle (**Abb. 4.22A**). Im TIRF-Modus zeigte diese Zelle unter basalen Bedingungen ein dicht verzweigtes Netzwerk aus feinen Aktin-Fasern. Mit der Umströmung mit 15 mM Glucose begann sich das feine Aktin-Netzwerk vor allem an der Peripherie der Zelle aufzulösen. Die größeren Filamente schienen davon nicht betroffen zu sein. Außerdem erschienen an den Stellen, an denen sich die Dichte des Aktin-Netzwerks verringerte, punktförmige Aktin-Strukturen. Die Effekte von 10  $\mu$ M Latrunculin waren in den TIRF-Aufnahmen eindrucklicher als in der Epifluoreszenz. Das feine Aktin-Netzwerk verschwand fast vollends und es blieb nur noch eine vergleichsweise grobe Struktur aus dickeren Aktin-Filamenten (**Abb. 4.22B**).

Die Messung der Granula-Zahl im TIRF-Modus ergab, dass es sowohl bei 15 mM Glucose als auch beim Latrunculin nur zu einem nicht-signifikanten Anstieg der Granula-Zahl kam. Zudem war die Fluoreszenzintensität der einzelnen Granula herabgesetzt.

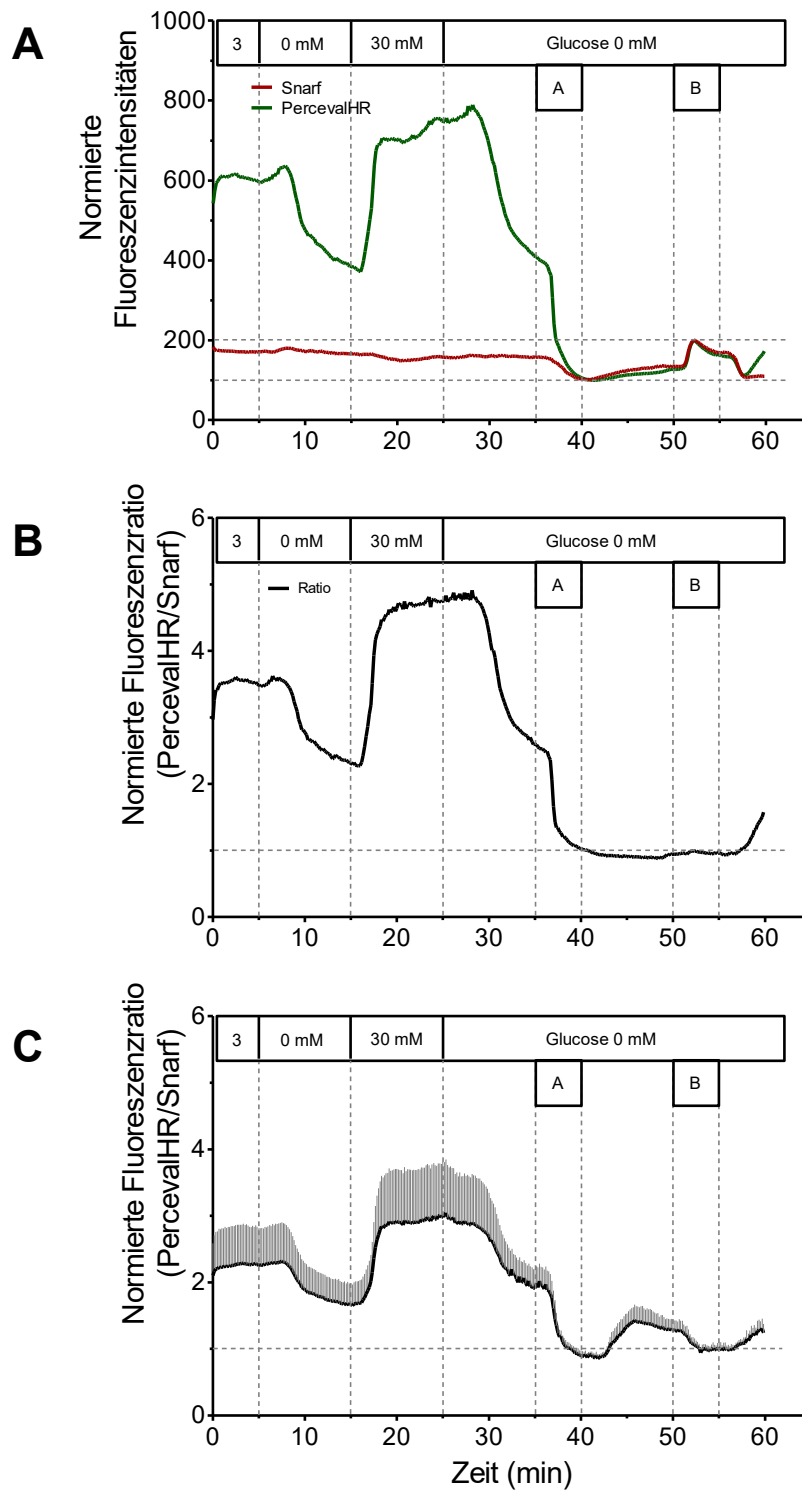
### **4.3 Dynamische Bestimmung der ATP/ADP-Ratio in MIN6-Zellen und primären beta-Zellen mittels PercevalHR**

In den hier dargestellten Messungen sollte das cytosolische Verhältnis von ATP und ADP mithilfe des fluoreszierenden Fusionsproteins PercevalHR, das bei ATP-Bindung seine Fluoreszenz-Eigenschaften ändert, dynamisch *in vivo* gemessen werden. Da die Fluoreszenz von PercevalHR pH-abhängig ist, wurde parallel der cytosolische pH-Wert mit dem pH-Indikator 5-(und 6)-Carboxy-SNARF<sup>TM</sup>-1 (im Folgenden nur als SNARF bezeichnet) bestimmt.

Die Zellen wurden 100 Minuten lang umströmt. Davon entfielen 40 Minuten auf die Vorlaufphase, in der sich die zuvor in Kultur befindlichen Zellen in der Umströmung stabilisieren konnten und 60 Minuten auf das eigentliche Experiment. In den Experimenten wurde die Glucose-Konzentration von Minute 5 – 15 von der basalen Konzentration (5 mM in Betazellen und 3 mM in MIN6-Zellen) auf 0 mM gesenkt. Von Minute 15 – 25 wurde dann ein Stimulus verwendet (30 mM Glucose, 10 mM KIC oder 40 mM KCl). Dann wurden die Stimuli von Minute 25 – 35 wieder ausgewaschen und die Zellen wieder mit Krebs-Ringer-Lösung mit 0 mM Glucose umströmt. Um die ATP-Konzentration danach auf einen Minimalwert zu senken, wurde der Lösung fünf Minuten lang 5 mM NaN<sub>3</sub> hinzugefügt, das in den folgenden zehn Minuten wieder ausgewaschen wurde. Danach folgte die Kalibrierung des pH-Wertes, die bei dieser minimalen ATP-Konzentrationen durchgeführt werden musste. Dafür wurde der Lösung fünf Minuten lang 10 mM NH<sub>4</sub>Cl hinzugefügt, die in den letzten fünf Minuten ausgewaschen wurden.

#### **4.3.1 Dynamische Bestimmung der ATP/ADP-Ratio in MIN6-Zellen**

Diese Versuche dienten zur Etablierung dieses Messverfahrens, da hierfür transiente Transfektionen ausreichend waren. Zunächst sollte die Wirkung von 30 mM Glucose auf die cytosolische ATP/ADP-Ratio von MIN6-Zellen beschrieben werden, dabei sollte auch geklärt werden, wie die pH-Korrektur in diesen Messungen durchzuführen ist.



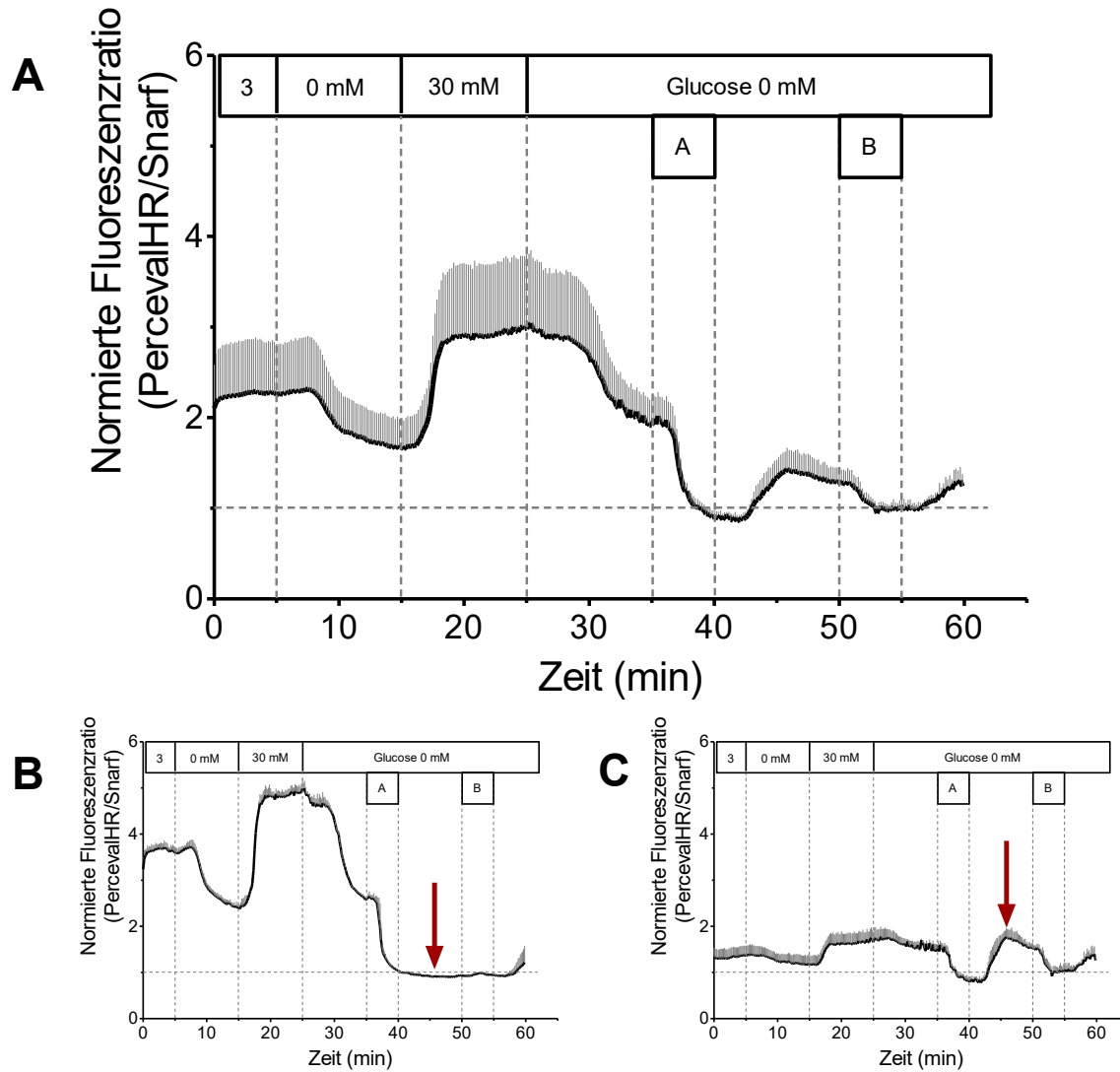
**Abbildung 4.23: Einfluss eines 30 mM Glucose-Stimulus auf die ATP/ADP-Ratio in MIN6-Zellen**

Die Messungen wurden an MIN6-Zellen durchgeführt, die mit PercevalHR transfiziert und mit SNARF beladen wurden. Mit PercevalHR wurde dabei das cytosolische ATP/ADP-Verhältnis bestimmt. Da die Fluoreszenz von PercevalHR allerdings pH-abhängig ist wurde zusätzlich das SNARF verwendet um parallel den cytosolischen pH-Wert zu messen. Nach der Messung konnte dann der Einfluss des pH-Wertes auf das PercevalHR-Signal minimiert werden. Die Zellen wurden 100 Minuten lang mit Krebs-Ringer-Lösung umströmt. Von Minute 5 – 15 wurde die Glucose-Konzentration von 3 mM auf 0 mM reduziert und von Minute 15 – 25 auf 30 mM erhöht. Ab

Minute 25 wurde die Glucose-Konzentration wieder auf 0 mM gesenkt. Von Minute 35 – 40 wurden 5 mM  $\text{NaN}_3$  (**A in Umströmung**) und von Minute 50 – 55 wurden 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (**B in Umströmung**) hinzugefügt. Die Mittelwerte der Rohdaten beider Fluoreszenzen wurden normiert (**A**), dabei wurde der lokale Minimalwert nach der Umströmung mit  $\text{NaN}_3$  auf 100% gesetzt und das lokale Maximum während der Umströmung mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  auf 200%. Dann wurde der Ratio-Wert aus der PercevalHR-Fluoreszenz und der SNARF-Fluoreszenz berechnet (**B**). Die so gebildeten Ratio-Werte zeigen den Verlauf der PercevalHR-Fluoreszenz und somit auch der ATP/ADP-Ratio, bei dem der Einfluss des pH-Wertes minimiert wurde. Diese Berechnung wurde für jeden Versuch durchgeführt. Der Mittelwert der pH-korrigierten Messungen zeigte einen Wiederanstieg der ATP/ADP-Ratio nach dem Einsatz von  $\text{NaN}_3$ . Das galt allerdings nur für einen Teil der Zellen (**C**). Angegeben wurde der Mittelwert + SEM von 5 Messungen.

Die Mittelwerte der gemessenen Rohdaten (hier nicht gezeigt) wurden für die beiden verwendeten Fluorophore (Perceval HR und SNARF) zunächst normiert, um die pH-Korrektur durchführen zu können. Dabei wurde das lokale Minimum nach der Umströmung mit 5 mM  $\text{NaN}_3$  auf den Wert 100 und das lokale Maximum des pH-Peaks, der mit 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  erzeugt wurde, auf den Wert 200 festgelegt (**Abbildung 4.23A**). Anschließend wurde die Ratio aus den beiden normierten Fluoreszenzintensitäten (PercevalHR/SNARF) berechnet. Diese stellt den pH-korrigierten Verlauf der ATP/ADP-Ratio dar. Die beiden Normierungspunkte nahmen in dieser Darstellung per Definition den Wert 1 an und der mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  erzeugt pH-Peak verschwand, da dieses Verfahren die um den pH-Einfluss auf PercevalHR korrigierten Werte ergab (**Abbildung 4.23B**). Aus den so erzeugten korrigierten ATP/ADP-Ratiowerten mehrerer Versuche wurde schließlich der Mittelwert berechnet. Dieser zeigt, dass die ATP/ADP-Ratio beim Wechsel von 3 mM Glucose auf 0 mM Glucose sank und mit dem Stimulus von 30 mM Glucose wieder deutlich anstieg. Das Auswaschen des Stimulus senkte die ATP/ADP-Ratio auf nahezu prästimulatorische Werte. Das  $\text{NaN}_3$ , das den vierten Komplex der Atmungskette blockiert, führte zu einer Senkung der ATP/ADP-Ratio auf minimale Werte (**Abbildung 4.23C**).





**Abbildung 4.24: Heterogener Verlauf der ATP/ADP-Ratio in MIN6-Zellen nach Verwendung eines 30 mM Glucose-Stimulus**

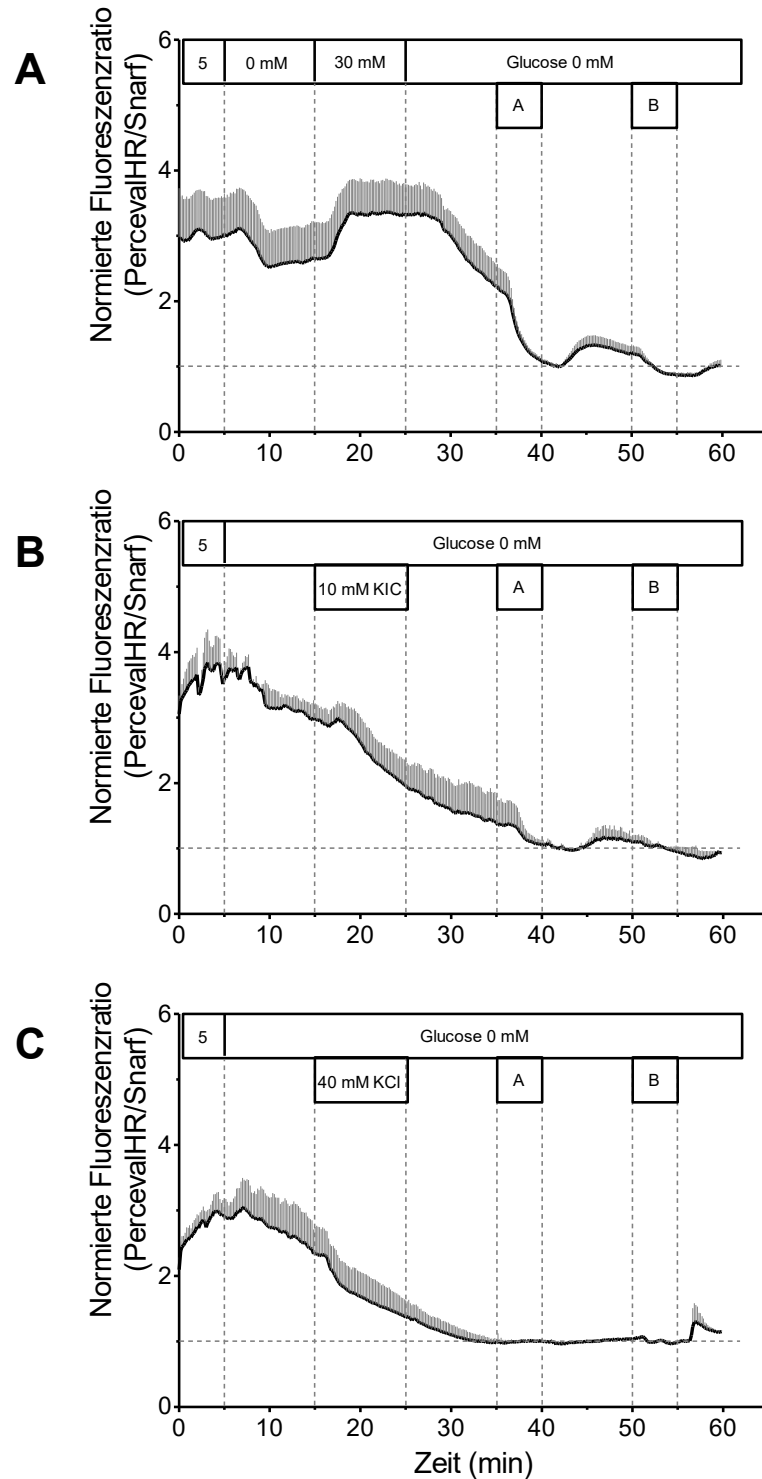
Die Messungen wurden an MIN6-Zellen durchgeführt, die mit PercevalHR transfiziert und mit SNARF beladen wurden. Sie wurden 100 Minuten lang mit Krebs-Ringer-Lösung umströmt. Von Minute 5 – 15 wurde die Glucose-Konzentration von 3 mM auf 0 mM reduziert und von Minute 15 – 25 auf 30 mM erhöht. Ab Minute 25 wurde die Glucose-Konzentration wieder auf 0 mM gesenkt. Von Minute 35 – 40 wurden 5 mM  $\text{NaN}_3$  (**A in Umströmung**) und von Minute 50 – 55 wurden 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (**B in Umströmung**) hinzugefügt. (**A**) Angegeben ist der Mittelwert + SEM von fünf pH-korrigierten ATP/ADP-Messungen. (**B,C**) Heterogenität der Messungen mit MIN6-Zellen. Die roten Pfeile zeigen, dass das ATP/ADP-Verhältnis in einigen Zellen nach dem Einsatz von 5 mM  $\text{NaN}_3$  konstant blieb (**B**) und in anderen Zellen anstieg (**C**).

Das geschilderte Verhalten der ATP/ADP-Ratio war bei Wiederholung mit einer anderen MIN6-Zellpräparation deutlich verändert. Der Mittelwert aller fünf Messungen (**Abbildung 4.24A**) ließ sich in zwei Gruppen aufteilen, je nachdem, ob beim Auswaschen des  $\text{NaN}_3$  die cytosolische ATP/ADP-Ratio wieder anstieg oder nicht. In den ersten drei Messungen stieg die ATP/ADP-Ratio nach dem Einsatz von  $\text{NaN}_3$  nicht wieder an. Diese Zellen zeigten bei den Messungen eine deutlich höhere dynamische Breite bei der Stimulation mit 30 mM Glucose (**Abbildung 4.24B**). Bei später durchgeführten Messungen stieg die ATP/ADP-Ratio nach dem Einsatz von  $\text{NaN}_3$  deutlich an. Dabei wurden sogar höhere Werte der ATP/ADP-Ratio erreicht als durch die vorherige Stimulation mit 30 mM Glucose (**Abbildung 4.24C**).

#### **4.3.2 Dynamische Messung der ATP/ADP-Ratio in Beta-Zellen unter dem Einfluss verschiedener Stimuli**

Die eigentlich vorgesehene Anwendung von PercevalHR war die Charakterisierung der dynamischen Änderung der ATP/ADP-Ratio in primären Beta-Zellen. Zusätzlich wurde auch der Einfluss von 10 mM KIC und 40 mM KCl auf die ATP-Konzentration überprüft und mit der Wirkung von 30 mM Glucose verglichen.

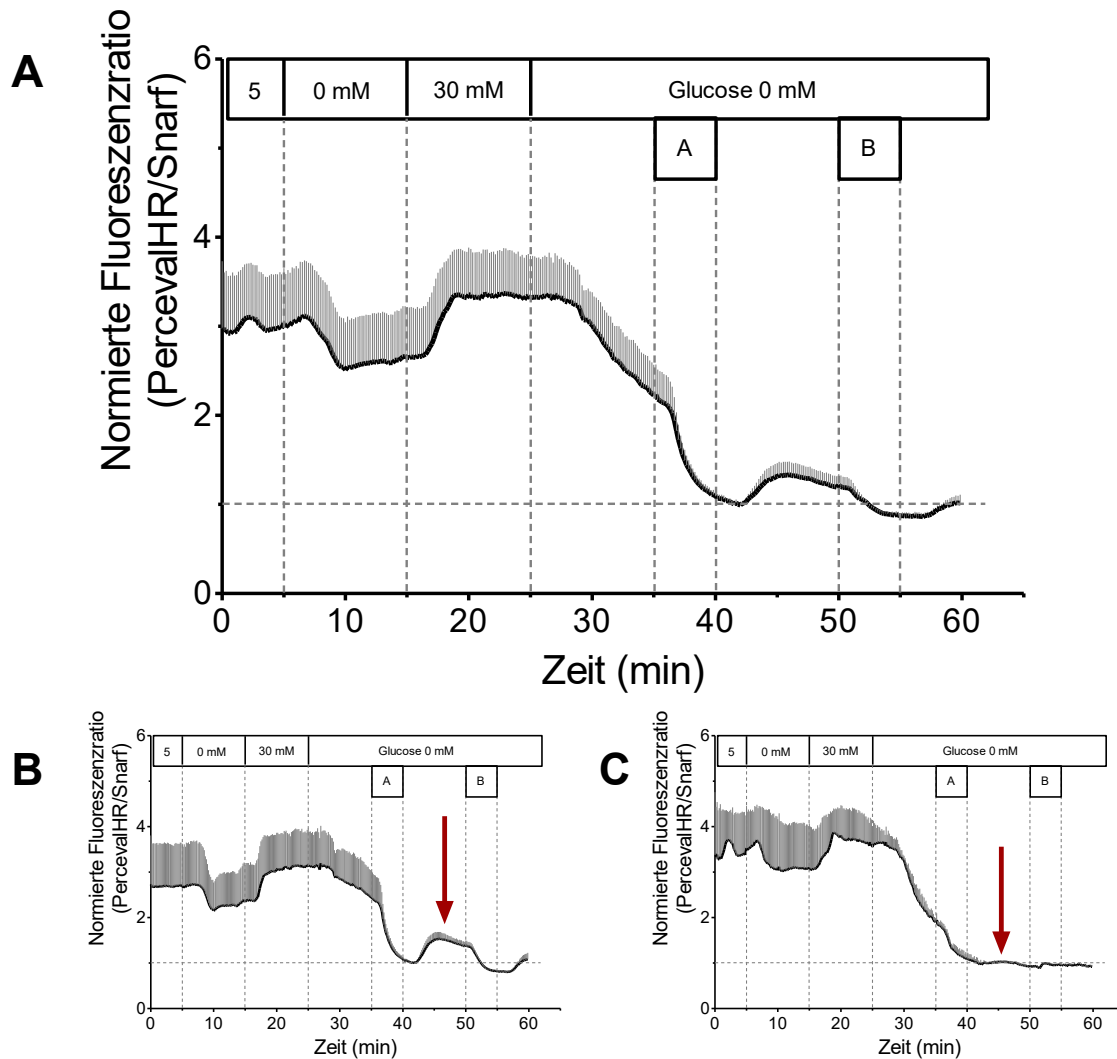
Die Wirkung von 30 mM Glucose auf die ATP/ADP-Ratio in Betazellen war vergleichbar mit derjenigen in den MIN6-Zellen. Verminderung der Glucose-Konzentration von 5 mM auf 0 mM ließ die ATP/ADP-Ratio abnehmen, der Wiederanstieg durch 30 mM Glucose hatte ein geringfügig größeres Ausmaß. Das Auswaschen von 30 mM Glucose führte nach kurzer Latenz zu einem linearen Abfall der Ratio (**Abbildung 4.25A**). Wurde statt 30 mM Glucose 10 mM KIC als Stimulus verwendet, kam es nur zu einem schwachen transienten Anstieg der ATP/ADP-Ratio, gefolgt von einem deutlichen Absinken noch während der Stimulation, das sich beim Auswaschen kontinuierlich fortsetzte (**Abbildung 4.25B**). Wurde 40 mM KCl als Stimulus eingesetzt, war zu beobachten, dass es zu einer direkten kontinuierlichen Abnahme der ATP-Konzentration kam, die sich beim Auswaschen fortsetzte. In diesem Fall wurden die Minimalwerte der ATP-Konzentration schon vor dem Einsatz des  $\text{NaN}_3$  erreicht (**Abbildung 4.25C**).



**Abbildung 4.25: Einfluss verschiedener Stimuli auf die ATP/ADP-Ratio in primären Beta-Zellen**

Die Messungen wurden an primären Beta-Zellen durchgeführt, die mit PercevalHR adenoviral transduziert und mit SNARF beladen wurden. Sie wurden 100 Minuten lang mit Krebs-Ringer-Lösung umströmt. Von Minute 5 – 15 wurde die Glucose-Konzentration von 5 mM auf 0 mM reduziert und von Minute 15 – 25 wurde der Stimulus dazugegeben. Die verwendeten Stimuli waren 30 mM Glucose (**A**), 10 mM KIC (**B**) und 40 mM KCl (**C**). Ab Minute 25 wurden die Stimuli wieder ausgewaschen. Von Minute 35 – 40 wurden 5 mM  $\text{NaN}_3$  (**A in Umströmung**) und von Minute 50 – 55 wurden 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (**B in Umströmung**) hinzugefügt. Angegeben ist jeweils der Mittelwert + SEM von mindestens 2 Messungen.

Wie zuvor bei den MIN6-Zellen zu beobachten war, zeigten auch die Beta-Zellen, die mit 30 mM Glucose stimuliert wurden, ein heterogenes Verhalten bezüglich des Wiederanstiegs der ATP/ADP-Ratio nach dem Auswaschen von  $\text{NaN}_3$ . Auch in dieser Darstellung wurde sowohl der Mittelwert aller fünf Messungen bestimmt (**Abbildung 4.26A**) als auch die Aufteilung der Versuche in die unterschiedlichen Reaktionsmuster durchgeführt.



**Abbildung 4.26: Heterogener Verlauf der ATP/ADP-Ratio in Beta-Zellen nach Verwendung eines 30 mM Glucose-Stimulus**

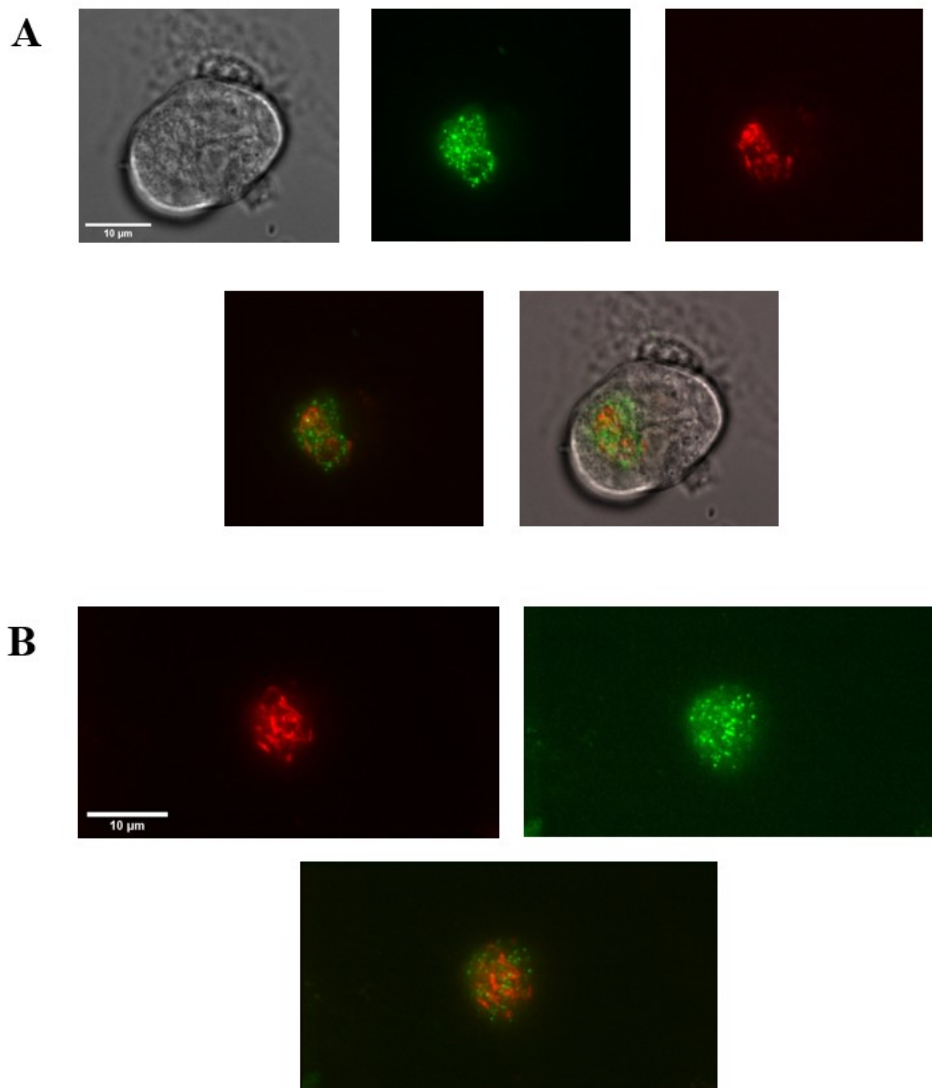
Die Messungen wurden an primären Beta-Zellen durchgeführt, die mit PercevalHR adenoviral transduziert und mit SNARF beladen wurden. Sie wurden 100 Minuten lang mit Krebs-Ringer-Lösung umströmt. Von Minute 5 – 15 wurde die Glucose-Konzentration von 5 mM auf 0 mM reduziert und von Minute 15 – 25 auf 30 mM erhöht. Ab Minute 25 wurde die Glucose-Konzentration wieder auf 0 mM gesenkt. Von Minute 35 – 40 wurden 5 mM  $\text{NaN}_3$  (**A in Umströmung**) und von Minute 50 – 55 wurden 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (**B in Umströmung**) hinzugefügt. (**A**) Angegeben ist der Mittelwert + SEM von fünf pH-korrigierten ATP/ADP-Messungen. (**B,C**) Zeigt die Heterogenität der Messungen mit Beta-Zellen. Die roten Pfeile zeigen, dass das ATP/ADP-Verhältnis in einigen Zellen nach dem Einsatz von 5 mM  $\text{NaN}_3$  anstieg (**B**) und in anderen Zellen konstant blieb (**C**).

Die ersten Messungen mit den primären Beta-Zellen zeigten einen Wiederanstieg der ATP/ADP-Ratio beim Auswaschen des  $\text{NaN}_3$ . Im Gegensatz zu den MIN6-Zellen blieben die ATP/ADP-Ratiowerte in den Beta-Zellen nach dem Wiederanstieg allerdings deutlich unter den ATP/ADP-Ratiowerten, die mit der Stimulation mit 30 mM Glucose erreicht wurden. Diese Zellen waren auch in der Lage die erhöhte ATP/ADP-Ratio beim Auswaschen des Glucose-Stimulus länger aufrecht zu erhalten (**Abbildung 4.26B**). Die Zellen, mit denen die späteren Messungen durchgeführt wurden, zeigten beim Auswaschen des Glucose-Stimulus ein deutlich schnelleres Absinken der ATP/ADP-Ratio. Bei diesen Zellen war kein Wiederanstieg der ATP/ADP-Ratio nach dem Auswaschen des  $\text{NaN}_3$  zu beobachten (**Abbildung 4.26C**).

Es ist wichtig darauf hinzuweisen, dass die Messungen mit 10 mM KIC und 40 mM KCl mit den gleichen Zellpräparationen durchgeführt wurden, wie die späteren Messungen mit 30 mM Glucose (**Abbildung 4.26C**) und daher eher mit diesen zu Vergleichen sind. An den generell beobachteten Unterschieden zwischen den Stimuli ändert sich bei dieser Betrachtung aber nichts.

#### 4.4 Die Lokalisation von submembranären Mitochondrien und die räumliche Beziehung zu den Insulin-Granula

Nachdem sich in früheren Versuchen an primären Beta-Zellen gezeigt hatte, dass neben den Insulin-Granula auch Mitochondrien im TIRF-Feld präsent sind, sollte die räumliche Beziehung zwischen beiden Organellen im submembranären Raum genauer charakterisiert werden. Für die parallele Darstellung der Insulin-Granula und der Mitochondrien wurden mit hIns-EGFP adenoviral transduzierte Beta-Zellen mit dem Indikator TMRE beladen.



**Abbildung 4.27: Verteilung der Mitochondrien und der Insulin-Granula in Beta-Zellen**

(A) Mit hIns-EGFP adenoviral transduzierte Beta-Zelle in einem Zellcluster, die außerdem mit TMRE beladen wurde um die Mitochondrien darzustellen. Dargestellt sind ein Durchlichtbild (**oben links**), die Mitochondrien mittels TMRE-Fluoreszenz (**oben Mitte**), die Granula-Fluoreszenz (**oben rechts**), die Projektion der beiden Fluoreszenzen aufeinander (**unten links**) und die Projektion der Fluoreszenzen auf das Durchlichtbild (**unten rechts**). (B) Darstellung einer einzelnen Beta-Zelle. Zu sehen sind die TMRE-Fluoreszenz (**oben links**), die Granula-Fluoreszenz (**oben rechts**) und die Projektion der beiden Fluoreszenzen aufeinander (**unten**). Maßstabsbalken = 10 µm

Hier wurde eine Beta-Zelle innerhalb eines Zellclusters parallel mit hIns-EGFP transduziert und mit TMRE beladen, während die anderen Zellen ungefärbt blieben. Die Insulin-Granula wurden in grün und die Mitochondrien in rot markiert. Es war auffällig, dass im Gegensatz zu den parallelen Darstellungen der Granula mit dem Aktin-Zytoskelett hier beide Strukturen (Granula und Mitochondrien) parallel scharf im TIRF-Feld dargestellt werden konnten. Bei der Projektion der beiden Fluoreszenzen aufeinander wurde deutlich, dass es keine ko-Lokalisation beider Strukturen gab (**Abb. 4.27A**). Auch in der doppelt markierten Einzelzelle wurde die wechselseitige ausschließende Lokalisation deutlich. Auch in dieser Zelle war eine gleichzeitige scharfe Darstellung beider Fluoreszenzen problemlos möglich (**Abbildung 4.27B**).

## 5 Diskussion

### 5.1 Methodische Vorbetrachtungen bezüglich der Markierung und der Nachverfolgung von Insulin-Granula mittels TIRF-Mikroskopie

Die MIN6-Zellen waren das geeignete Modell in vorangegangenen Arbeiten, um die Methodik, insbesondere hinsichtlich der quantitativen Auswertung zu etablieren, da sie in großer Zahl und relativ gleichmäßiger Qualität zu kultivieren sind. Außerdem sind die MIN6-Zellen vergleichsweise robust und leicht zu transfizieren. Dennoch erschien es notwendig, die Ergebnisse im nächsten Schritt mit isolierten primären Beta-Zellen zu überprüfen, da nur diese hinsichtlich des Metabolismus, der für die Glucose-induzierte Insulin-Sekretion entscheidend ist, ein Physiologie-nahes Modell darstellen. Dieser Aspekt ist insbesondere wichtig, wenn die Reaktion auf einen Nährstoffstimulus wie Glucose mit derjenigen auf einen rein depolarisierenden Stimulus wie 40 mM KCl verglichen werden soll. Zudem können sich MIN6-Zellen je nach Sublinie und Passagenzahl sogar untereinander unterscheiden (192,170). Andererseits ist die Messung der makroskopischen Sekretion mit MIN6-Zellen besser in Beziehung zur Einzelzell-Exozytoserate zu setzen, da die MIN6-Pseudoinseln (193,194) nur aus einem Zelltyp bestehen und die innerhalb der Pankreasinseln bestehenden Wechselwirkungen zwischen den Beta-Zellen und den anderen Zelltypen nicht berücksichtigt werden müssen. Insofern ist zu erwarten, dass sich die Exozytoseraten von einzelnen Beta-Zellen durchaus von der Sekretionskinetik intakter Pankreasinseln unterscheiden können (195–197).

#### 5.1.1 Messungen der cytosolischen Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) als Qualitätskontrolle für die Intaktheit der Stimulus-Sekretionskopplung in Beta-Zellen

Die Sekretionsantwort auf eine Kalium-Depolarisation wird hauptsächlich, wenn nicht sogar ausschließlich, als Konsequenz des  $Ca^{2+}$ -Einstroms durch spannungsabhängige Calciumkanäle und der damit einhergehenden Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  betrachtet (198,167). Bei der Sekretion durch einen Glucose-Stimulus gilt der Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ , verursacht durch den Einstrom durch spannungsabhängige Calciumkanäle, als notwendig um die Sekretion auszulösen (Triggering Pathway). Allerdings ist unklar, in welchem Ausmaß dieses Signal die Intensität und den Verlauf der Sekretionsantwort bestimmt. Es ist jedoch klar, dass bei der Glucose-stimulierten



Sekretion zusätzliche Signale, die aus dem Glucose-Stoffwechsel stammen, eine wesentliche Rolle spielen (Amplifying Pathway) (90,99).

Viele unserer Messungen der  $[Ca^{2+}]_i$  dienten als Qualitätskontrolle für die späteren Beobachtungen der Granula in einzelnen Beta-Zellen mit der TIRF-Methode (siehe: Kapitel 5.1.3). Dabei fiel zuerst auf, dass die  $[Ca^{2+}]_i$  in einzelnen Beta-Zellen bei 37 °C nach 20 bis 30 Minuten kontinuierlich Anstieg und nicht wieder gesenkt werden konnte. Das ist zum einen ein Beleg dafür, dass einzelne Beta-Zellen wesentlich weniger robust sind als solche innerhalb einer Insel. Zum anderen wurde aufgrund dieser Tatsache entschieden, dass alle Messungen an Einzelzellen bei 32 °C anstatt bei 37 °C durchgeführt werden.

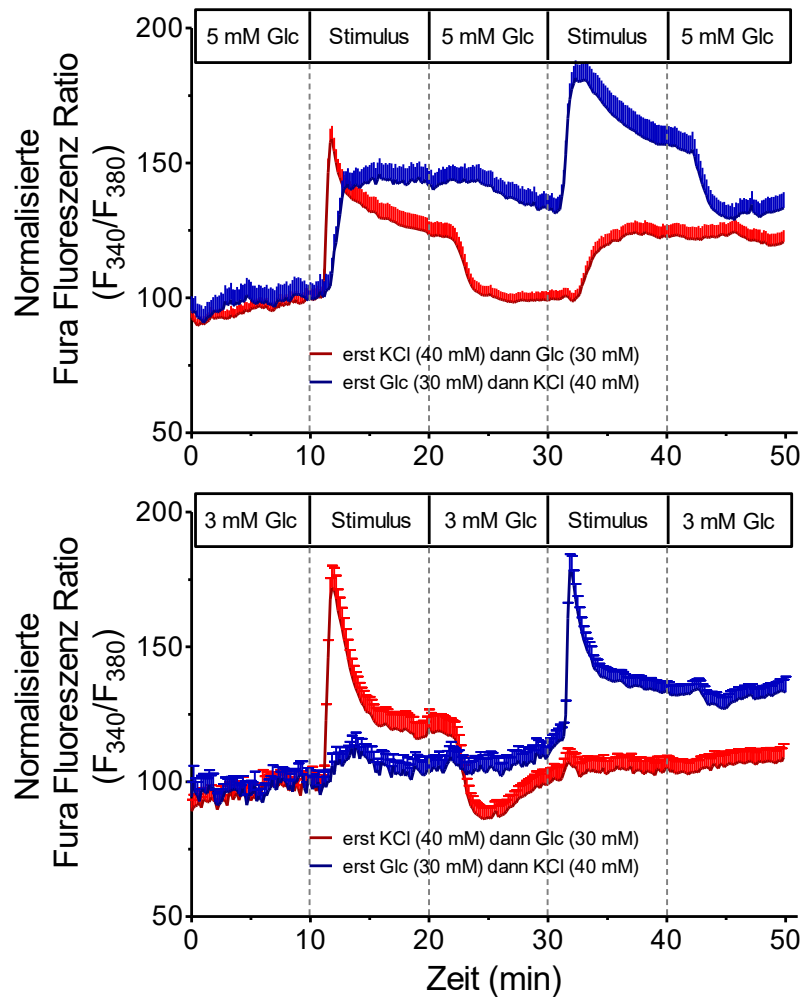
Eine Stimulation mit 40 mM KCl verursachte eine starke, initial überschießende Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ , die anschließend schnell auf eine Plateau-Konzentration sank. Nach dem Auswaschen fiel die  $[Ca^{2+}]_i$  dann schnell wieder auf prästimulatorische Werte. Die Stimulation mit 30 mM Glucose führte zu einer langsamen Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ , die ebenfalls in einer Plateau-Konzentration mündete. Die durch Glucose hervorgerufene Plateau-Konzentration war allerdings höher als die, die durch KCl hervorgerufen wurde. Nach dem Auswaschen des Glucose-Stimulus sank die  $[Ca^{2+}]_i$  nur langsam auf den prästimulatorischen Wert. War KCl der Stimulus, so war die Steigerung der  $[Ca^{2+}]_i$  unabhängig davon ob ein Glucose-Stimulus voranging oder nicht. War hingegen Glucose der Stimulus, so war die Steigerung der  $[Ca^{2+}]_i$  verringert, wenn sie einer Kalium-Depolarisation folgte. Dieses Phänomen war auch auf der Ebene der makroskopischen Sekretion der Pankreasinseln zu beobachten (siehe: Kapitel 5.1.4).

Die Messung der  $[Ca^{2+}]_i$  wurde auch verwendet, um zu prüfen, wieweit die adenovirale Transduktion einen möglicherweise schädigenden Einfluss auf die Stimulus-Sekretionskopplung hatte. Zwar zeigte die mit der Transduktion einhergehende Zellkulturphase von vier Tagen einen inhibierenden Einfluss auf die  $Ca^{2+}$ -Antwort auf beide Stimuli, ein darüber hinausgehender Effekt der Transduktion ließ sich aber nicht nachweisen. Die Beobachtung, dass im Verlauf einer mehrtägigen Zellkulturphase das  $[Ca^{2+}]_i$ -Muster als Antwort auf einen Glucose-Stimulus abflacht, stimmt mit früheren Ergebnissen der Gruppe um HENQUIN überein (199). In unseren Versuchen erwies sich KCl als der robustere der beiden Stimuli. Das war unter anderem dadurch zu erkennen, dass sich die Plateau-Konzentrationen der  $[Ca^{2+}]_i$  nach einer vier-tägigen Zellkulturphase mit beiden Stimuli angeglichen haben. Da eine mindestens drei-tägige Zellkulturphase für die Transduktion unabdingbar ist, ist also die Aussagekraft der Methodik für die Wirkungen rein depolarisierender Stimuli höher als für die Wirkungen metabolischer Stimuli.

Eine weitere Messung der  $[Ca^{2+}]_i$  als Qualitätskontrolle betraf die Frage, wieweit die Fluoreszenzanregung im TIRF-Modus die Stimulus-Sekretionskopplung beeinträchtigt. Hierzu wurden Beta-Zellen, die im TIRF-Feld waren, mit umliegenden Beta-Zellen verglichen, die keiner Fluoreszenzanregung ausgesetzt waren. Bei den Beta-Zellen im TIRF-Feld wurde eine leicht erhöhte basale  $[Ca^{2+}]_i$  und eine leicht verringerte  $[Ca^{2+}]_i$ -Antwort auf beide Stimuli beobachtet. Dies könnte zu den schrittweise veränderten Mobilitätsparametern beigetragen haben, die auftraten, wenn zwei TIRF-Sequenzen kurz aufeinander folgten. In späteren Versuchen wurde deshalb das Messprotokoll dahingehend abgeändert, dass die Abstände zwischen den Aufnahmen von Bildsequenzen gleich gehalten wurden.

Die Messung der  $[Ca^{2+}]_i$  intakter Maus-Inseln zeigte im Prinzip mit beiden Stimuli das gleiche Verhalten wie einzelne Beta-Zellen. Ein möglicher Grund hierfür könnte die elektrische Kopplung innerhalb der Inseln sein, durch die das Calciumsignal innerhalb der Insel zwischen den Zellen synchronisiert wird (200,201). Diese Kopplung wird zum Beispiel durch das kanalbildende Protein Connexin36 vermittelt (202). Allerdings fielen die Steigerungen der  $[Ca^{2+}]_i$  durch die Stimuli in den Inseln geringer aus als in den einzelnen Beta-Zellen. Frühere vergleichende Messungen der  $[Ca^{2+}]_i$  an MIN6-Pseudoinseln und MIN6-Monolayern zeigten diese Unterschiede nicht (170). Ein möglicher Grund für diesen Unterschied zwischen Beta-Zelle und MIN6-Zelle kann sein, dass die Zellen innerhalb eines MIN6-Monolayers auch über Connexin36 miteinander gekoppelt sind, wenn auch nicht in gleichem Maße wie die in den Pseudoinseln (203).

In den vorangegangenen Messungen an MIN6-Zellen und MIN6-Pseudoinseln zeigte sich außerdem, dass diese auf KCl zwar mit dem typischen Muster reagierten, allerdings nicht in der Lage waren die  $[Ca^{2+}]_i$  als Reaktion auf einen Glucose-Stimulus zu steigern. Einzelne Beta-Zellen reagierten auf beide Stimuli mit einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  (**Abbildung 5.1**). MIN6-Pseudoinseln zeigten eine kontinuierliche  $[Ca^{2+}]_i$  Oszillation, die erst mit dem Einsatz eines depolarisierenden Stimulus verschwand, aber unter dem Einfluss eines Glucose-Stimulus bestehen blieb (170). Dies zeigt erneut, dass die MIN6-Zellen nur bedingt als Modell für die primäre Beta-Zelle geeignet sind.



**Abbildung 5.1: Vergleich der  $[Ca^{2+}]_i$  einzelner Beta-Zellen und MIN6-Zellen während der Stimulation mit 30 mM Glucose oder 40 mM KCl**

Die Beta-Zellen bzw. die MIN6-Zellen wurden 50 Minuten lang mit Krebs-Ringer-Lösung umströmt. Von Minute 10 – 20 wurde die Konzentration der Kalium-Ionen auf 40 mM erhöht und die Glucose-Konzentration wurde von Minute 30 – 40 auf 30 mM erhöht (**Rot**). Die Stimuli wurden auch in umgekehrter Reihenfolge eingesetzt (**Blau**). Dargestellt ist der Verlauf der  $[Ca^{2+}]_i$  in primären Beta-Zellen (**A**) und in MIN6-Zellen (**B**) bei 32 °C. Die Kurven wurden zu Minute 10 auf den Wert 100 normalisiert, da die Effekte der Stimuli auf diese Weise besser zu vergleichen waren. Vorher gab es einen leichten, nicht signifikanten Unterschied in der prästimulatorischen Fura-Ratio. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte + SEM aus 3 Versuchen (A, erst Glc; B, erst KCl; B, erst Glc) oder aus 4 Versuchen (A, erst KCl).

### 5.1.2 Messung der ko-Lokalisation zweier Granula-Label als qualitative Kontrolle der so markierten Granula-Populationen

Es ist bekannt, dass ein Fluoreszenzlabel Einfluss auf das Verhalten der Granula haben kann. Die Gruppe um CHOW hat diesbezüglich gezeigt, dass die Freisetzungskinetik der Insulin-Granula vom Fusionsprotein abhängig war, mit dem die Granula markiert wurden. Selbst der

Linker, der zwei Teile eines Fusionsproteins verbindet, hatte einen Einfluss auf die Freisetzungskinetik (184). Aus diesem Grund war geplant die TIRF-mikroskopischen Untersuchungen der Granula mit zwei Fluoreszenz-Labeln durchzuführen um Label-spezifische Effekte bezüglich der Granula-Dynamik auszuschließen.

Es gibt mehrere Regionen eines Granulums, die durch fluoreszierende Fusionsproteine markiert werden können. Ein Ansatz ist es, diejenigen Proteinstrukturen zu markieren, die im Inneren des Sekret-Granulums lokalisiert sind. Insulin-EGFP befindet sich im kristallinen Kern des Granulums, während sich C-Peptid-Label in der Halo-Region befinden, die den kristallinen Kern umgibt (176). Zudem ist beschrieben worden, dass das Fusionsmuster von C-Peptid-Labeln dem physiologischen Ablauf am ähnlichsten sei (184,204). Es gab die Erwägung, dass Fluoreszenzproteine, die in der Granulum-Membran lokalisiert sind (205), Wechselwirkungen des Granulums mit Transportmechanismen oder auch mit der Plasmamembran stören könnten. Aus diesem Grund wurden nur Label verwendet, die im Inneren des Granulums lokalisiert sind.

In den folgenden Untersuchungen wurde zunächst überprüft, inwieweit die zeitgleiche Markierung der Granula mit zwei verschiedenen Insulinfusionsproteinen ein deckungsgleiches Granula-Muster produziert. Um zwei Insulinfusionsproteine vergleichen zu können, wurden sie so gewählt, dass sie verschiedene Emissionsbereiche aufwiesen. Ein Fusionsprotein emittierte rotes Fluoreszenzlicht und das andere emittierte grünes Fluoreszenzlicht. So wurde bestimmt ob und welche Label biologisch gleiche Granula-Populationen markieren und in diesem Sinne vergleichbar sind.

Bei der Messung der ko-Lokalisation mit den verschiedenen Fluoreszenz-Labeln waren jeweils die größten Unterschiede bei einer ko-Transfektion von hIns-tDimer mit einem anderen Label zu beobachten. Dabei waren die beobachteten Granula mit hIns-tDimer deutlich größer, zugleich aber weniger zahlreich als die anderen markierten Granula. Der Grund dafür liegt womöglich darin, dass das tDimer, als Tandem-Dimer von DsRed, sehr groß ist und die Faltung des Fusionsproteins beeinträchtigen kann. Dadurch könnte es auch indirekt die Bildung der Granula beziehungsweise die Abschnürung der Granula von Trans-Golgi-Netzwerk beeinträchtigen (206). Die ko-Lokalisation zwischen den monomeren Labeln war insgesamt deutlich besser, wobei die größte Übereinstimmung mit mIns-C-mCherry und mIns-C-emGFP zu sehen war. Insgesamt ist davon auszugehen, dass durch die Markierung mit allen drei monomeren Labeln prinzipiell immer die gleiche biologische Grundgesamtheit der Granula betrachtet wird.

Die Entscheidung hIns-EGFP und mIns-C-emGFP zu verwenden basiert auf der großen strukturellen Ähnlichkeit zwischen EGFP und emGFP, die sich nur in drei Aminosäuren unterscheiden. Insofern sind noch bestehende Unterschiede wahrscheinlich auf die markierte Struktur, d.h. den kristallinen Kern der Granula bei hIns-EGFP und die Halo-Region der Granula bei mIns-C-emGFP, und dadurch bewirkte Effekte auf Funktionen der Granulum-Membran zurückzuführen (207). So wurden individuelle Sets von Experimenten mit diesen Labeln durchgeführt und eventuelle Wechselwirkungen durch eine doppelte Markierung der Granula während der TIRF-Experimente vermieden. Effekte, die mit beiden Labeln gleichermaßen zu sehen waren, wurden als Label-unabhängig angesehen.

### **5.1.3 Messung der Zahl und Dynamik der Insulin-Granula in einzelnen Beta-Zellen und Bestimmung des Einflusses eines 40 mM KCl- und eines 30 mM Glucose-Stimulus auf diese Parameter**

TIRF-mikroskopischen Untersuchungen submembranärer Granula können zur Aufklärung verschiedener Fragestellungen dienen. Zum einen kann das Ziel sein, molekulare Interaktionen zwischen den Granula mit ihren Zielstrukturen an der Plasmamembran zu untersuchen (208). Zum anderen kann das Freisetzungverhalten des Inhalts der Granula und damit zusammenhängend die Dynamik der Fusionspore untersucht werden (204,209). Die dritte Möglichkeit ist die Analyse von Anzahl und Mobilität der submembranären Granula um zu zeigen inwiefern das Verhalten der Granula vor der Fusion zum biphasischen Sekretionsmuster beiträgt. Der zuletzt beschriebene Ansatz wird im Rahmen dieser Arbeit behandelt.

Bei einem generellen Vergleich der beiden verwendeten Label bezüglich Anzahl und Mobilität der Granula in den Zellen zu Beginn der Versuche unter Kontrollbedingungen hatte sich gezeigt, dass die durchschnittliche Anzahl der Granula in Beta-Zellen mit beiden Labeln gleich war. Die im TIRF-Feld sichtbare Kontaktfläche der Zellen, die mit mIns-C-emGFP markiert wurden, war geringfügig, aber signifikant größer als mit hIns-EGFP. Die biologische Bedeutung dieses Befundes ist allerdings unklar.

Der Unterschied zwischen Beta-Zellen und MIN6-Zellen ist allerdings deutlich. Die Anzahl der Granula im TIRF-Feld ist in MIN6-Zellen deutlich höher als in primären Beta-Zellen. Die größere Kontaktfläche der MIN6-Zellen zum Deckglas, ist vermutlich dafür verantwortlich. Während die Beta-Zellen abgerundet erscheinen, haben die MIN6-Zellen eine unregelmäßige Form, z.T. mit schmalen Zellausläufern, da diese sich fester an die unphysiologische Glasoberfläche anheften können (171). Auch bezüglich der Granula-Mobilität gibt es

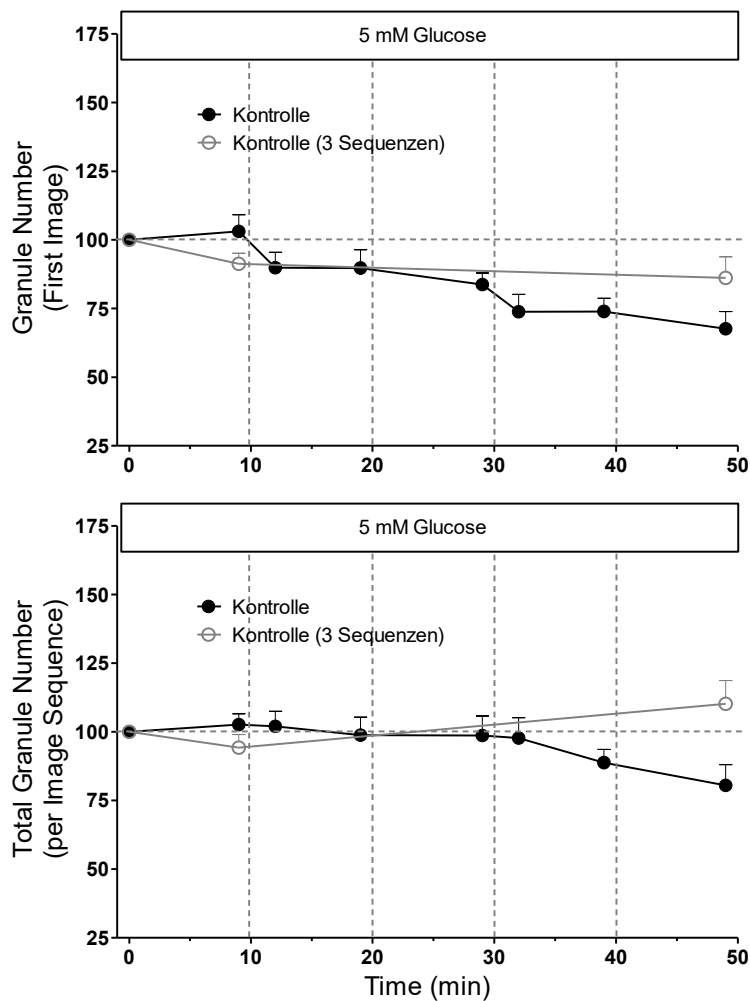
Unterschiede zwischen den primären Beta-Zellen und der MIN6-Zelllinie. Dies zeigt sich zum einen in leicht erhöhten Werten bei den Short-term Resident Granules und bei den Arriving Granules und zum anderen daran, dass die Granula an der Plasmamembran in MIN6-Zellen im Zeitraum einer Sequenz deutlich häufiger ausgetauscht werden (**Tabelle 5.1**).

**Tabelle 5.1: Vergleich typischer Granula-Parameter in Beta-Zellen, die mit hIns-EGFP oder mIns-C-emGFP transduziert wurden, mit typischen Granula-Parametern aus MIN6-Zellen. Die Zellen wurden während der Messung mit 3 mM Glucose (MIN6-Zellen oder mit 5 mM Glucose (Beta-Zellen) umströmt.**

Parameter	MIN6-Zellen (hIns-EGFP)	Beta-Zellen (hIns-EGFP)	Beta-Zellen (mIns-C-emGFP)
<b>Auflagefläche der Zelle</b>	-----	102 ± 13	168±21
<b>Granule Number (First Image)</b>	408 ± 32	175 ± 16	201 ± 26
<b>Total Granule Number per Sequence</b>	9253 ± 935	2314 ± 207	2681 ± 269
<b>Turnover</b>	22,7	13,4	13,3
<b>Short-term Resident Granules</b>	7736 ± 852 (83,6 ± 0,7 %)	1874 ± 176 (79,8 ± 0,8 %)	2153 ± 234 (80,3 ± 0,7 %)
<b>Long-term Resident Granules</b>	144 ± 20 (35,2 ± 2,0 %)	75 ± 11 (43,1 ± 2,2 %)	61 ± 14 (31,9 ± 2,7 %)
<b>Arriving/Departing Granules (Difference between Images)</b>	9,7 ± 0,7%	6.3 ± 0,3%	7,0 ± 0,4%
<b>Caging Diameter (at Half-Maximal Abundance)</b>	122,5 ± 3 nm	82,5 ± 1,5 nm	85,5 ± 1,5 nm

Zunächst wurden Kontrollperfusionen durchgeführt in denen durchgehend mit einer basalen Glucose-Konzentration von 5 mM umströmt wurde, um später die Einflüsse der Stimuli auf die Granula-Parameter klar definieren zu können. Das war nötig, weil sich die gemessenen Parameter auch unter Kontrollbedingungen innerhalb der 50 minütigen Messungen veränderten. Die Veränderungen der Granula-Zahl und -Mobilität, die in den Kontrollperfusionen zu beobachten waren, können am besten mit dem Ausbleichen der Fluorophore (210) und mit anderen reversiblen funktionellen Veränderungen durch die lokal begrenzte Fluoreszenzanregung erklärt werden. Diese Erklärung wird durch ein weiteres

Kontrollexperiment gestützt, in dem die Anzahl der aufgenommenen TIRF-Sequenzen von acht auf drei und damit die absorbierte Energie auf 37% reduziert wurde. In diesen Experimenten war, bei gleicher Perifusionsdauer eine deutlich geringere Reduktion der Granula-Zahlen im ersten Bild und praktisch keine Reduktion der Gesamtzahl der Granula pro Sequenz zu beobachten (**Abbildung 5.2**).



**Abbildung 5.2: Auswirkung der Belichtung im TIRF-Modus auf die Kontrollmessungen**

Die Beta-Zellen wurden mit hIns-EGFP transduziert. Während der Messung wurden die Beta-Zellen 50 Minuten mit Krebs-Ringer-Lösung mit einer basalen Glucose-Konzentration umströmt. Es wurden Sequenzen von 200 Bildern, entweder an 8 repräsentativen Zeitpunkten während der Umströmung, (**geschlossene Kreise**) oder an 3 Zeitpunkten, von denen 2 am Anfang der Umströmung lagen und eine am Ende (**offene Kreise**), aufgenommen. Die dargestellten Parameter sind die Anzahl der Granula im ersten Bild (**A**), die Gesamtzahl der Granula in der Sequenz (**B**). Angegeben ist jeweils der Mittelwert + SEM von mindestens 5 Messungen.

Während der einzelnen Sequenzen war zu beobachten, dass mIns-C-emGFP anfälliger für Veränderungen aufgrund der Belichtungen war, wobei man bei längeren Intervallen zwischen

den Sequenzen, bei beiden Labeln, eine deutliche Erholung feststellen konnte. Insgesamt sah das Verhalten der Granula mit beiden Labeln qualitativ sehr ähnlich aus. Wobei die vorherigen Bestimmungen der ko-Lokalisation mit zwei Labeln (siehe: Kapitel 4.1.2) zur Vorsicht vor voreiligen Verallgemeinerungen mahnen sollten. Da aber bei beiden Labeln unter konstanten Kontrollbedingungen inkonstante Werte resultierten war es nötig, die Kontrollwerte von den eigentlichen Versuchswerten zu subtrahieren und die Interpretation bezüglich der biologischen Sachverhalte auf die Nettowerte zu stützen. Die Daten anderer Arbeitsgruppen beruhen darauf, die prästimulatorischen Werte als interne Kontrolle für die TIRF-Daten zu verwenden. In Anbetracht der Ergebnisse der Kontrollperfusionen erscheint diese Art der internen Kontrolle allerdings unzureichend, besonders wenn mit hoher Bildaufnahmefrequenz und dadurch bedingter nahezu kontinuierlicher Fluoreszenzanregung gearbeitet wird (211,212). Dieses Problem wird womöglich durch die Gabe der Stimuli als konzentrierter Bolus zu den statisch inkubierten Zellen auf dem Mikroskoptisch noch verstärkt (211,212,166,213).

Die Betrachtung der mittleren Nettowerte beider Label führt zu folgenden Schlussfolgerungen. Zunächst führte die Stimulation mit 40 mM KCl, entgegen der Erwartungen aus der „Pool-Size-Hypothese“, nicht zu einer stärkeren Reduktion der Granula-Zahl im TIRF-Feld als ein 30 mM Glucose-Stimulus. Die „Pool-Size-Hypothese“ besagt, dass sich die Granula in verschiedene Pools mit unterschiedlichen Größen und Eigenschaften unterteilen (163). Allerdings ergaben sich, bei der Betrachtung der Mobilität der Granula in Z-Richtung, durchaus Unterschiede zwischen KCl- und Glucose-Stimuli. Da die Mobilität in Z-Richtung zu einer Zahl an identifizierten Granula führt, die höher ist als der bekannte Gesamtbestand der Granula in einer Zelle (214), ist ein Austausch der Granula an der Plasmamembran, ein so genannter „Granule Turnover“, anzunehmen (169). Dieser wird durch die Arriving Granules, die Verweildauer der Granula an der Plasmamembran (Short-term Resident Granules) und die Departing Granules bestimmt.

Glucose verringerte den Turnover der Granula, wenn es als erster Stimulus eingesetzt wurde, wohingegen KCl die entsprechenden Parameter leicht, allerdings nicht signifikant, erhöhte. Daraus ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Stimuli. Auch beim Einsatz einer geringeren Glucose-Konzentration von 15 mM konnte die gleiche Verringerung der Granula-Mobilität in der Z-Dimension beobachtet werden (siehe: Kapitel 4.2.2). Dies könnte darauf hinweisen, dass Stoffwechselstimuli die Verweildauer der Granula an der Plasmamembran erhöhen. Möglicherweise ist die erhöhte Verweildauer an der Plasmamembran durch amplifizierende Signale vermittelt (215). Die Amplifizierenden Signale könnten so die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass ein Granulum an die Plasmamembran andocken und



schließlich seinen Inhalt ausschütten kann. Die Total Granule Number sank parallel mit dem Granule-Turnover, beziehungsweise mit den Parametern, die mit dem Granule-Turnover zusammenhängen. Dabei hängt die Total Granule Number intrinsisch mit den entsprechenden Mobilitätsparametern, den Arriving Granules und den Short-term Resident Granules, zusammen (170,168). So steigt die Total Granule Number logischerweise, wenn mehr Granula aus dem Zellinneren an der Plasmamembran ankommen (Arriving Granules) und dann wieder ins Zellinnere verschwinden. Das passiert besonders häufig, wenn die Verweildauer der Granula an Plasmamembran gering ist (Short-term Resident Granules).

Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten Unterschiede zwischen den Effekten von 40 mM KCl und 30 mM Glucose. So ist die Membran-Depolarisierung durch KCl stärker und verursacht keine einzelnen Aktionspotentiale. Der dazugehörige Calcium-Einstrom ist kontinuierlich und die makroskopische Sekretion zeigt höhere anfängliche Spitzenwerte, fällt aber schnell wieder ab ohne sich zu erholen (216,217). Das stimmt mit der Beobachtung überein, dass durch eine Depolarisation mit KCl eher die Granula mit der Plasmamembran fusionieren, die schon vorher dort waren und mit einem Glucose-Stimulus eher die Granula fusionieren, die aus dem Zellinneren neu an der Plasmamembran ankommen (218). Allerdings widerspricht dieser Befund scheinbar den hier präsentierten Daten, dass Glucose im Vergleich zu KCl den Turnover der Granula an der Plasmamembran verringert. Diese Unterschiede könnten auf die verschiedenen Granula-Populationen zurückgeführt werden, die in den jeweiligen Studien betrachtet wurden. In diesen Messungen haben wir die Gesamtheit der Granula im submembranären Raum untersucht, während die Publikation der Gruppe um SEINO (212,218) sich ausschließlich mit denjenigen Granula befasste, die mit der Plasmamembran fusionierten.

Der zuvor angesprochene Unterschied zwischen KCl und Glucose konnte auch beim Caging Diameter beobachtet werden. Dieser Parameter erlaubt es, die zeitaufgelöste Änderung der Beweglichkeit zu beschreiben und ist damit dem viel verwendeten Parameter „mean square displacement“ überlegen, da letzterer ein konstantes Bewegungsmuster im beobachteten Zeitrahmen voraussetzt (219). Im konkreten Fall beschreibt der Caging Diameter die Beweglichkeit der Granula in der X/Y-Ebene, was der Beweglichkeit der Granula parallel zur Plasmamembran entspricht (168). Auch hier war KCl mit einer vergleichsweise höheren Mobilität der Granula assoziiert. Dieser Effekt, der erst verzögert während des Auswaschens des ersten Stimulus auftrat, könnte ein Sekundäreffekt sein, welcher auf die Änderung der Mobilität in der Z-Dimension folgt. Denn eine Erklärung dieses Effekts könnte die, durch den Glucose-Stimulus bedingte, längere Verweildauer der Granula an der Plasmamembran sein, die

mit einer geringeren lateralen Beweglichkeit der Granula assoziiert ist (170). Die so genannten „Cages“, die die Mobilität der Granula begrenzen und hier zunächst funktionell definiert werden um Beschränkung der Mobilität der Granula parallel zur Plasmamembran zu beschreiben, sind wahrscheinlich abhängig vom kortikalen Aktin-Zytoskelett (220).

In Übereinstimmung mit vorherigen Beobachtungen zur Mobilität und Fusion von Granula in Chromaffin-Zellen (221), konnte vor kurzem von der Gruppe um SOLIMENA auch für Insulin-Granula eine Abhängigkeit der Granula-Mobilität vom Alter des Granulums gezeigt werden (222–224). Im Gegensatz zu den Granula aus den Chromaffin-Zellen, in denen die Mobilität mit dem Alter stieg, wurde allerdings für die Insulin-Granula eine verringerte Mobilität mit dem Alter festgestellt. Dabei lag der Altersunterschied der betrachteten Granula-Population bei fünf Stunden. In welchen Zusammenhang diese Eigenschaft mit dem Turnover an der Plasmamembran oder der erhöhten Wahrscheinlichkeit der Ausschüttung neu synthetisierter Granula steht ist allerdings noch unklar (225–227).

In früheren Untersuchungen an MIN6-Zellen, die unter denselben Bedingungen durchgeführt wurden, erhöhten sowohl KCl als auch Glucose der Turnover der Granula an der Plasmamembran. Nur Glucose tat dies allerdings auf temperaturabhängige Weise. Dieser Befund wurde von einer deutlich höheren Temperatur-Sensitivität der Sekretion begleitet (170). Die Berechnung von Nettowerten war hier nicht notwendig, da die Änderungen der Granula-Parameter bei den Kontrollperfusionen im Vergleich zu den Effekten der Stimuli deutlich geringer ausfielen. Dies zeigt nochmals das unterschiedliche Verhalten von MIN6-Zellen im Vergleich mit primären Beta-Zellen.

Die Anzahl der Exozytosen in MIN6-Zellen war etwa fünf Mal höher als in Beta-Zellen. Allerdings zeigte sich, wie in den aktuellen Experimenten, keine Häufung der Exozytosen während der Stimulation mit KCl oder Glucose und der mit den Stimuli einhergehenden erhöhten makroskopischen Insulin-Sekretion (170) (siehe: Kapitel 5.1.4). Folgende Faktoren könnten dieser Diskrepanz zugrunde liegen:

### 1) Die Detektionsmethode

Der Detektionsalgorithmus des Detektionsprogramms ist so angelegt, dass es zwei Ereignisse benötigt um eine Exozytose als solche zu erkennen. Zuerst muss es einen starken Anstieg, direkt gefolgt von einem starken andauernden Abfall der Fluoreszenz geben. Dieser Abfall muss außerdem vom Auftreten einer sich ausbreitenden Wolke fluoreszierenden Materials begleitet werden (168). Das könnte eine zu große Einschränkung bei der Detektion der Granula sein. Allerdings könnte die von vielen anderen Gruppen durchgeführte nicht-verblindete Beobachter-basierte Auswertung auch zu einer Voreingenommenheit („bias“) bei der Quantifizierung geführt haben.

### 2) Der Label

Mit Granula-Labels, die auf EGFP und emGFP basieren, wird eine schnelle Erhöhung der Fluoreszenz bei Öffnung der Fusionspore beobachtet. Diese beruht darauf, dass die Fluoreszenzintensität beim leicht sauren pH-Wert im Granulum partiell gelöscht wird, bis sich die Fusionspore öffnet und pH-Wert schlagartig steigt (204). Sollte dieser Prozess sich allerdings über eine längere Zeit hinziehen, kann das dazu führen, dass keine schlagartige Erhöhung der Fluoreszenzintensität detektiert werden kann. Außerdem ist es möglich, dass die Fusionspore einen Filtereffekt auf die Freisetzung der relativ großen Fusionsproteine hat (228,229). Dieser Filtereffekt könnte die Entstehung einer verschwindenden Wolke fluoreszierenden Materials verhindern, welche wiederum ein notwendiges Kriterium bei der Computer-gestützten, Beobachter-unabhängigen Auswertung ist.

### 3) Die Trennung der Insel in Einzelzellen

Die koordinierten Interaktionen der Beta-Zellen innerhalb der Insel erhöhen die insulinotrope Effektivität der Stimuli im Vergleich zu einzelnen Beta-Zellen deutlich (230–232). Demnach kann die Exozytoserate der Granula in Inseln und Zellclustern die makroskopische Insulin-Sekretion widerspiegeln (233,234). Dies scheint für einzelne Beta-Zellen, die mehrere Tage in der Zellkultur verbrachten, nicht mehr zu gelten. Die Rolle der Inselumgebung, inklusive der extrazellulären Matrix, für den Prozess der Exozytose wurde durch die Beobachtung hervorgehoben, dass Beta-Zellen innerhalb der Insel ihre Granula in Richtung des Gefäßsystems ausschütten (235).

#### **5.1.4 Vergleich der makroskopischen Insulin-Sekretion primärer Inseln mit dem mikroskopischen Beobachtungen primärer Beta-Zellen**

Die Insulin-Sekretion wurde gemessen, um die bisherigen mikroskopischen Ergebnisse, d.h. Freisetzung von Insulin auf der Ebene einzelner Granula, in einen makroskopischen Zusammenhang zu bringen. Dies wird durch den Vergleich mit der Menge des tatsächlich freigesetzten Insulins erreicht. Die Menge des freigesetzten Insulins wird typischerweise durch die Umströmung mehrerer Inseln bestimmt. Größenordnungsmäßig beträgt der Unterschied eine Beta-Zelle, von der nur ca. 30% sichtbar sind, in der TIRF-Mikroskopie gegenüber mindestens 50.000 Beta-Zellen bei der Umströmung von 50 Pankreasinseln der Maus (236). Als weiterer Parameter lässt sich prüfen, inwiefern die Effekte der Stimuli auf die  $[Ca^{2+}]_i$  sich auf der Ebene der Sekretion wiederfinden lassen.

Die gemessenen Sekretionsverläufe waren hinsichtlich der Kinetik bei 32°C und 37°C sehr ähnlich. Die Ergebnisse der TIRF-Experimente, die bei 32°C durchgeführt werden mussten, können somit als physiologisch relevant angesehen werden. Eine weitere häufig verwendete Methode um das freisetzungverhalten auf Ebene des einzelnen Granulums zu untersuchen ist die Messung der Membrankapazität, die ebenfalls bei Temperaturen unter 37 °C gemessen werden muss (237,164). Bei den Sekretionsversuchen konnten folgende temperaturbedingte Unterschiede in den Sekretionsantworten auf die Stimulationen mit KCl oder Glucose festgestellt werden:

- 1) Die Sekretionssteigerung, die Glucose hervorrief, wurde durch eine vorangegangene Depolarisation mit KCl bei 37°C nur moderat verringert, während bei 32°C eine starke Verringerung zu beobachten war.
- 2) Die Sekretionssteigerung durch KCl war bei 37°C unabhängig von der Reihenfolge der Stimuli, wurde allerdings bei 32°C durch einen vorangegangenen Glucose-Stimulus verstärkt. Dabei waren die Spitzenwerte der Sekretion allerdings nicht erhöht. Das könnte daran liegen, dass diese sich möglicherweise an der oberen Grenze der Bestimmbarkeit des verwendeten ELISAs befanden.

Als generelle Regel kann, übereinstimmend mit früheren Untersuchungen von NESHER und CERASI (238,239), geschlussfolgert werden, dass ein rein depolarisierender Stimulus einen nachfolgenden Glucose-Stimulus schwächt, während ein Glucose-Stimulus die Effektivität einer nachfolgenden Depolarisation verstärkt. Dieses Sekretionsverhalten stimmt qualitativ gut mit den zuvor gemessenen Veränderungen der  $[Ca^{2+}]_i$ , sowohl hinsichtlich der einzelnen Effekte der Stimuli als auch hinsichtlich des Einflusses des ersten Stimulus auf den Zweiten, überein.

Das beschriebene Exozytose-Verhalten der Einzelzellen spiegelte sich auf der Ebene der makroskopischen Sekretion allerdings nicht wieder. Wie zuvor erwähnt könnte die Einzelzellexistenz während der vorangegangenen Zellkulturphase ebenso wie während der TIRF-mikroskopischen Untersuchungen ein Grund dafür sein. Die Arbeitsgruppen, die als erste über die TIRF-Mikroskopie von Insulin-Granula publiziert haben, haben jedoch die Exozytoseraten der von ihnen untersuchten Einzelzellen direkt auf die allgemein bekannten Charakteristika der makroskopischen Sekretion bezogen (211,212,240). Die von ihnen aufgezeigten Entsprechungen von hoher Exozytoserate einerseits und erster Phase der Insulin-Sekretion andererseits treffen aber nur dann zu, wenn die erste Phase in der TIRF Mikroskopie mit vier bis fünf Minuten angenommen wird (241–243,160), während die erste Phase der Glucose-induzierten Insulin Sekretion mit bis zu 15 Minuten deutlich länger ist (239,160). Diese Diskrepanz könnte möglicherweise damit erklärt werden, dass einige Beta-Zellen in der Insel später auf einen Stimulus reagieren als andere. Es ist belegt, dass die Beta-Zellen untereinander elektrisch gekoppelt sind und insofern weitgehend synchron reagieren (202,244). Eine relevante Verzögerung der Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  in ihrem Ausbreiten über die Pankreasinsel wurde jedoch am Modell des vitalen Pankreasschnitt gezeigt (245). In den letzten Jahren mehren sich jedoch die Publikationen, in denen die Unterschiede zwischen dem Exozytose-Verhalten von einzelnen Zellen und denen von Beta-Zellen innerhalb des Inselverbands betont werden. Um die Exozytosen von Beta-Zellen innerhalb der Insel zu untersuchen ist allerdings eine andere mikroskopische Technik als die TIRF-Mikroskopie notwendig. Momentan wird dieser Ansatz vor allem mit der konfokalen Mikroskopie (234) und der 2-Photonen-Mikroskopie (235) verfolgt.

Tatsächlich lässt sich als Ziel für zukünftige Untersuchungen der Exozytose definieren, diese und sowohl die Anzahl als auch den Austausch der submembranären Granula unter Bedingungen zu untersuchen, welche denjenigen der makroskopische Sekretionskinetik gleichkommen. Dafür scheint es essenziell zu sein, ganze Inseln oder zumindest Cluster in einer angemessenen Umgebung zu untersuchen und eine Kombination aus Labeln zu verwenden, bei der ein Label eine Struktur innerhalb der Granula markiert und der andere extrazellulär vorliegt (204,235). Zudem kann sich wegen der absehbar schwierigen Transduktion ganzer Inseln in Kultur die Notwendigkeit eines transgenen Mausmodells mit Markierung der Insulin-Granula ergeben, ein Beispiel hierfür wäre die von der Gruppe um SOLIMENA untersuchte „SOFIA-Maus“ (Study OF Insulin granule Aging) (222).

## 5.2 Vergleich und physiologische Einordnung von 15 mM Glucose und 30 mM Glucose als Stimuli für die Insulin-Sekretion

Der zuvor eingesetzte 30 mM Glucose-Stimulus ist auf der Basis der Insulin-Sekretion eine maximal effektive Konzentration. Nun soll dieser Stimulus mit 15 mM Glucose, einer Konzentration, die näher an den physiologischen maximal erreichbaren Glucose-Konzentrationen liegt, verglichen werden. Die Sekretionsantwort auf einen 15 mM Glucose-Stimulus ist in Mäusen *in vivo* (246), aber auch *in vitro*, also dem von uns verwendeten Modell (247), deutlich geringer als auf einen 30 mM Glucose-Stimulus. Bei Betrachtung menschlicher Inseln oder Beta-Zellen ist das allerdings anders, da in diesen die Sekretionsantwort auf beide Konzentrationen fast gleich stark ausfällt. Insgesamt ist die Antwort auf Glucose-Stimulation im Menschen verglichen mit Mäusen nach links verschoben (59,248).

Das zeigt, dass es wichtig ist, die Daten im Zusammenhang mit dem verwendeten Modell zu interpretieren. Es soll nicht unerwähnt bleiben, dass auch 15 mM Glucose keine Konzentration ist, die sich nach einer Mahlzeit im Blut wiederfindet. Allerdings ist es mit der Umströmung der Zellen oder Inseln, wie sie von fast allen Gruppen verwendet wird, ohnehin nicht möglich das physiologische Glucose-Profil, das nach einer Mahlzeit entsteht, nachzustellen, da die Glucose-Konzentration nach einer Mahlzeit deutlich langsamer ansteigt und auch langsamer wieder abflacht. Bei der Umströmung spricht man hingegen von einem Rechteck-Stimulus, bei dem der Stimulus sofort mit voller Konzentration einsetzt und auch sofort wieder ausgewaschen wird. Das „klassische“ biphasische Sekretionsmuster ist auch nur unter diesen Bedingungen zu sehen (249). *In vivo* wird der initiale Anstieg als „early insulin secretion“ bezeichnet und ist vor allem für die Wirkung von Insulin auf die Leber wichtig (250). Die Umströmung ist dennoch das beste Modell um die Effekte von Stimulationen dynamisch zu betrachten. Ein anderes häufig verwendetes Modell ist, den Stimulus als konzentrierten Bolus zu einer statischen Inkubation zuzugeben. Dabei kann allerdings die Konzentration des Stimulus an der Insel vorübergehend noch höhere Werte annehmen, bevor sich ein „steady state“ einstellt.

### 5.2.1 Einfluss verschiedener Glucose-Konzentrationen auf die $[Ca^{2+}]_i$

Es wurde zuerst untersucht ob sich, analog zur Sekretion, auch für die  $[Ca^{2+}]_i$  ein Unterschied der Effektivität der beiden Glucose-Konzentrationen zeigen lässt. Das würde bedeuten, dass es sich bei den Sekretionsunterschieden zumindest teilweise um einen Calciumeffekt handelt. Das war in unseren Versuchen allerdings nicht der Fall, da 15 mM Glucose die  $[Ca^{2+}]_i$  fast im

gleichen Maße steigerte wie 30 mM Glucose. Das spricht eher dafür, dass die gegenüber 15 mM Glucose erhöhte Sekretion bei 30 mM Glucose eher durch amplifizierende Signale aus dem Glucose-Stoffwechsel vermittelt wird.

Wie in der vorherigen Messreihe (siehe: Kapitel 5.1.1), wurden auch hier die Messungen der  $[Ca^{2+}]_i$  dazu verwendet, um die Intaktheit der Stimulus-Sekretions-Kopplung nach der Transduktion der Zellen und der damit einhergehenden Zellkulturphase zu überprüfen. Die Besonderheit, die in dieser Versuchsreihe zu berücksichtigen war, ist die parallele Transduktion mit zwei Labeln, also mit hIns-EGFP für die Granula und tagRFP-Lifeact für das Aktin-Zytoskelett. Diese Untersuchungen zeigten die gleichen Effekte, die auch zuvor beschrieben wurden. Der Verlauf der  $[Ca^{2+}]_i$  flachte durch die lange Zellkulturdauer ab, während auch die ko-Transduktion keinen weiteren Einfluss auf die  $[Ca^{2+}]_i$  hatte.

### **5.2.2 Einfluss der Glucose-Konzentration auf Anzahl und Mobilität submembranärer Insulin-Granula**

Auch bei den Messungen der Anzahl und Mobilität der Granula stand die Frage im Vordergrund, ob Unterschiede zwischen 15 mM Glucose und 30 mM Glucose erkennbar waren. Bei Betrachtung der Nettowerte waren für die Stimulation mit Glucose generell die gleichen Tendenzen zu erkennen wie in der vorherigen Messreihe (siehe: Kapitel 5.1.3). Es zeigten sich in dieser Messreihe aber keine plötzlichen Änderungen der Parameter, da die zeitlichen Abstände zwischen allen Messsequenzen gleich waren. Sowohl bei 15 mM Glucose als auch bei 30 mM Glucose waren diejenigen Parameter, die den Granula-Turnover beschreiben (Arriving Granules, Short-term Resident Granules) vermindert.

Die Ausnahme war die Total Granule Number, die in der vorherigen Messreihe auch sank, in dieser allerdings nicht. Diese sind allerdings nicht ausschließlich vom Austausch der Granula an der Plasmamembran, sondern auch von der Anzahl der Granula im ersten Bild abhängig, die in dieser Messreihe kontinuierlich anstiegen. Mit Ausnahme der starken Senkung der Granula im ersten Bild direkt am Anfang der Messung konnte diese Tendenz allerdings auch in den vorangegangenen Messungen beobachtet werden (siehe: Kapitel 4.1.3). Bezüglich des Vergleichs beider Glucose-Konzentrationen war es bemerkenswert, dass 15 mM Glucose mindestens einen genauso großen Effekt auf den Granula-Turnover hatte wie 30 mM Glucose. Die mit 15 mM Glucose ausgelöste Senkung der Arriving Granules und der Short-term Resident Granules war mit 30 mM Glucose gegen Ende der Messungen sogar leicht rückläufig. Das könnte allerdings auch an der Dauer des Versuchs liegen, da die Senkung dieser Parameter



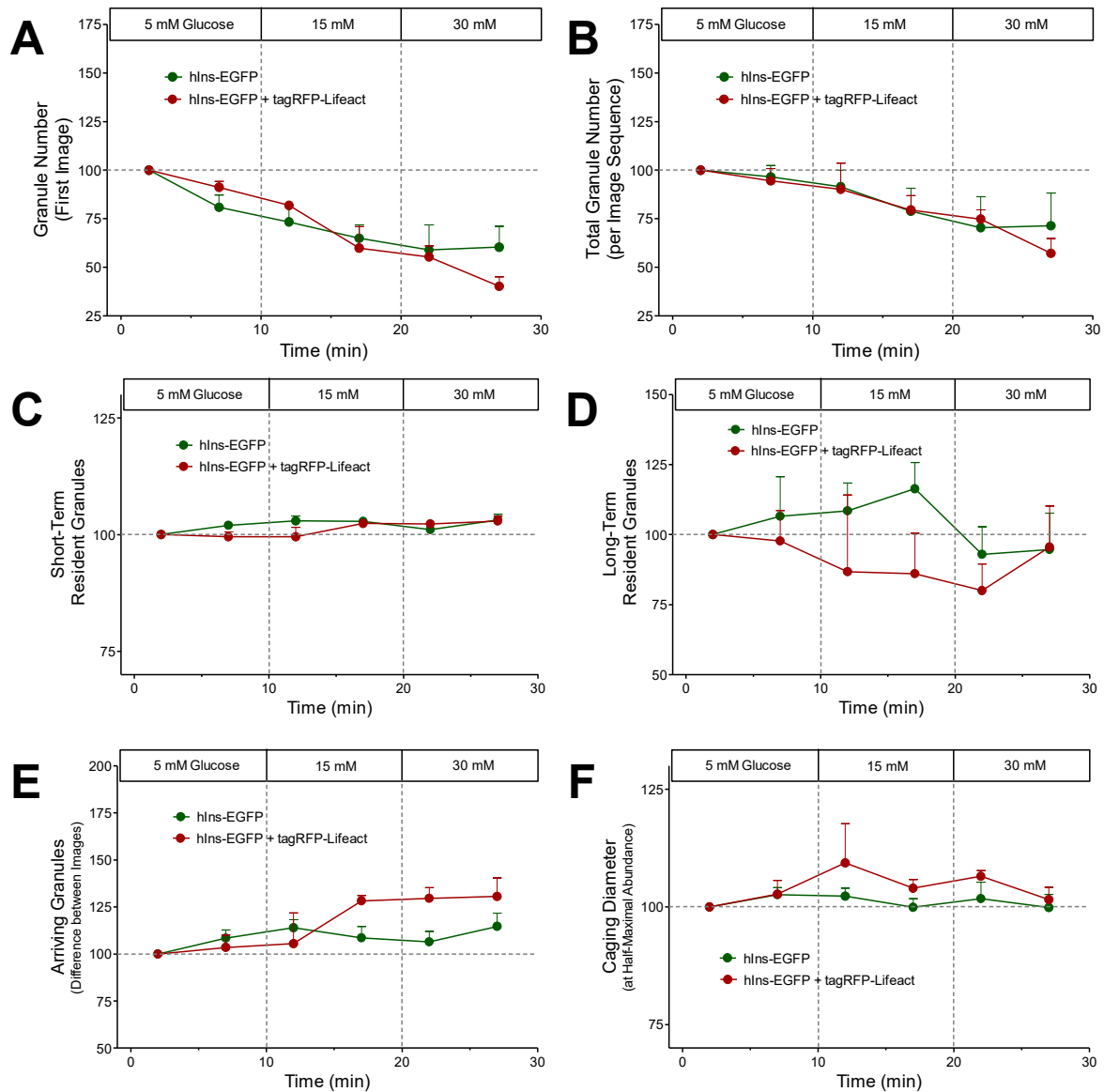
in der vorherigen Messreihe auch nur dann eindeutig zu sehen war, wenn Glucose der erste Stimulus war (siehe: Kapitel 4.1.3). Alles in allem schien der Effekt beider Glucose-Konzentrationen auf die Mobilität der Granula fast gleich zu sein. Das könnte bedeuten, dass die stärkere Insulin-Sekretion bei 30 mM Glucose zwar wahrscheinlich durch amplifizierende Signale zu erklären ist (siehe: Kapitel 5.2.1), diese sich allerdings scheinbar weniger auf der Ebene der Mobilität bemerkbar machen, sondern möglicherweise eher Einfluss auf die Fusion der Granula haben könnten.

Wie schon in den früheren Messungen konnten nur wenige Exozytosen beobachtet werden, die auch nicht gehäuft auftraten, wenn ein Stimulus zugegen war. Daher kann auf diese Weise kein Vergleich mit der Sekretion bei unterschiedlichen Glucose-Konzentrationen erfolgen. Dennoch gibt es Arbeitsgruppen, die erhöhte Exozytoseraten durch die Stimulation mit Glucose, sowohl in Beta-Zellen innerhalb der Maus-Insel (233) als auch in einzelnen Beta-Zellen von Mäusen (212,241,242) beobachten konnten.

In der Insel konnte der Arbeitskreis um THORN gesteigerte Fusionsraten mit den Glucose-Stimuli beobachten, allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen verschiedenen stimulatorischen Glucose-Konzentrationen im Bereich zwischen 8 mM und 20 mM feststellen (233). Das liegt möglicherweise daran, dass nur eine Ebene innerhalb der Insel betrachtet werden kann und viele Fusionsereignisse, die in anderen Bereichen der Insel stattfinden, nicht registriert werden können. Auch auf der Ebene der Einzelzellen wurden von verschiedenen Gruppen unterschiedliche Glucose-Konzentrationen verwendet, die sich im Bereich zwischen 16,7 mM (212,242) und 22 mM (241) befanden. Ein Problem der Auswertung in diesen Publikationen ist allerdings, dass die Exozytosen jeweils von verschiedenen Personen manuell gezählt wurden (211). Zudem wurde der Glucose-Stimulus in mindestens zwei der Gruppen als konzentrierter Bolus hinzugegeben (212,241). Bei dieser Methode ist es zumindest zu Beginn einer Messung, wenn die meisten Exozytosen detektiert werden, fraglich, ob die Durchmischung der Lösungen schnell genug ist, oder ob die hochkonzentrierte Glucose-Lösung auf die Zellen absinkt und sich erst später soweit durchmischt, dass die Zellen mit der angegebenen Konzentration in Berührung kommen. Eine aussagefähige TIRF-Messung der Exozytoseraten, die sich gleichzeitig mit steigender Glucose-Konzentration entwickeln, steht bisher noch aus.

Während der Messungen wurde auch der Einfluss des tagRFP-Lifeact, dem zweiten verwendeten Label, auf die Granula-Mobilität untersucht. Diese Messung ergab, dass die ko-

Transduktion mit hIns-EGFP und tagRFP-Lifeact, im Vergleich zur einfachen Transduktion nur mit hIns-EGFP, keinen Einfluss auf die Mobilität der Granula hat (**Abbildung 5.3**).



**Abbildung 5.3: Einfluss der Transduktion der Beta-Zellen mit hIns-EGFP und tagRFP-Lifeact auf Anzahl und Mobilität der der Insulin-Granula im TIRF-Feld**

Die primären Beta-Zellen wurden entweder nur mit hIns-EGFP (**Grüne Linie**) oder mit hIns-EGFP und tagRFP-Lifeact (**Rote Linie**) transduziert. Am Tag der Messung wurden die Zellen 30 Minuten mit Krebs-Ringer-Lösung umströmt. Von Minute 10 – 20 wurde die Glucose-Konzentration von 5 mM auf 15 mM erhöht. Von Minute 20 – 30 wurde sie weiter erhöht auf 30 mM. An 6 repräsentativen Zeitpunkten wurden Sequenzen von 200 Bildern aufgenommen. Die gemessenen Parameter waren die Anzahl der Granula im ersten Bild (**A**), die Gesamtzahl der Granula in der Sequenz (**B**), die Short-term Resident Granules (**C**), die Long-term Resident Granules (**D**), die Arriving Granules (**E**) und der Caging Diameter (**F**). Angegeben ist jeweils der Mittelwert + SEM aus 5 Versuchen.

Mit diesem Messprotokoll wurden außerdem noch zwei Tests bezüglich der Vorbereitung der Zellen für die Versuche durchgeführt. Zum einen wurde getestet, ob die Verwendung von Beschichtungen mit Collagen IV oder Fibronectin auf der Oberfläche des Deckgläschens dazu führen, dass mehr Exozytosen beobachtet werden können. Dieser Versuch basierte darauf, dass wir bis dahin nur wenige Exozytosen beobachten konnten und die Gruppe um PETER THORN zeigen konnte, dass Beta-Zellen dazu tendieren ihre Granula in Richtung bestimmter Bestandteile der extrazellulären Matrix auszuschütten (235,251). Auch während dieser Untersuchungen konnten wir allerdings weder eine generelle Erhöhung der Exozytoserate noch vermehrte Exozytosen aufgrund der verwendeten Stimuli beobachten. Ursache ist hier wahrscheinlich, dass die zur Beschichtung gemachten technischen Angaben nur unvollständig waren.

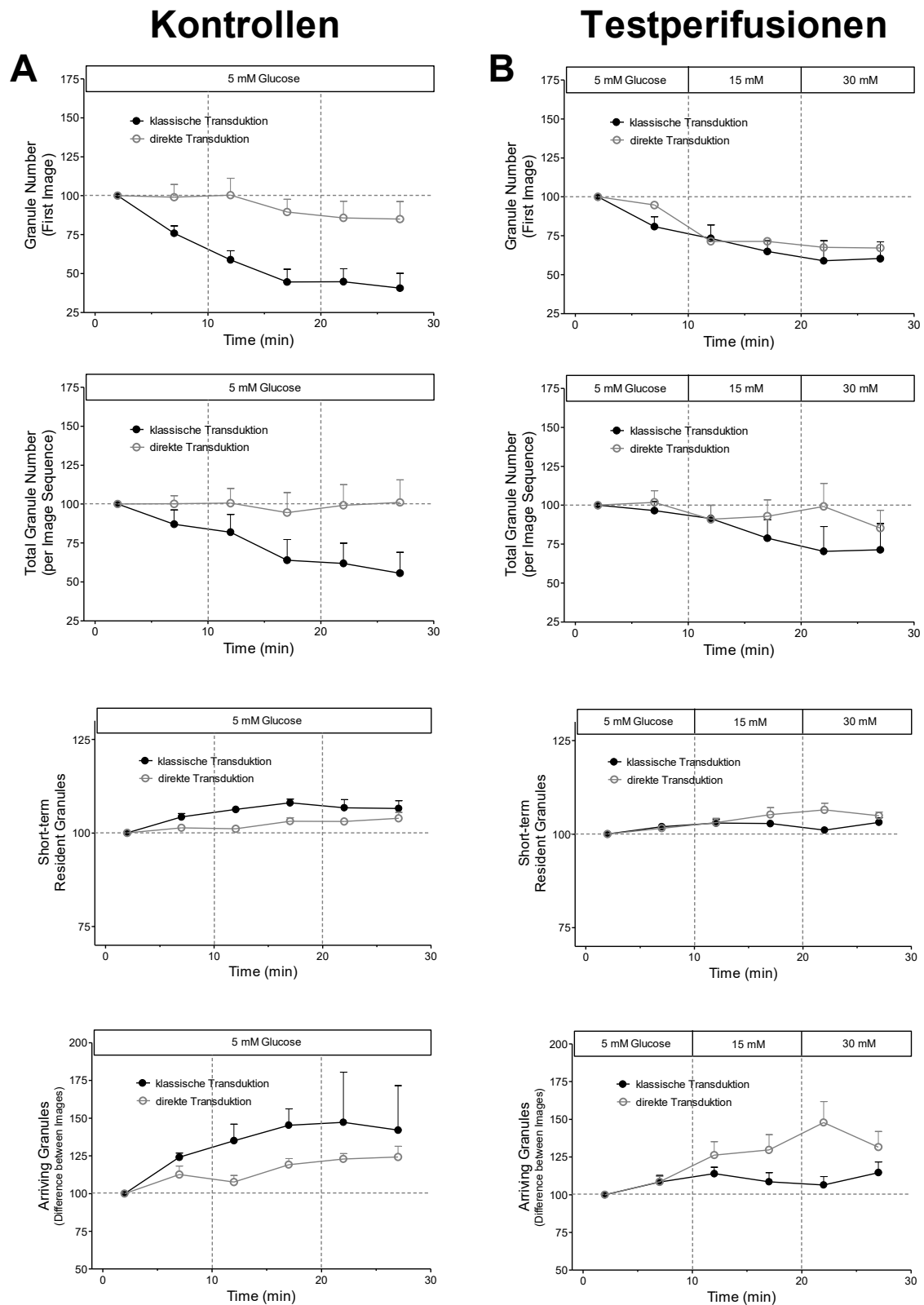
Zum anderen wurde, in weiteren separaten Messungen, eine alternative Transduktionsmethode getestet, bei der die Zellen direkt am Tag der Kultivierung transduziert wurden (siehe: Kapitel 3.4.5.2), diese wird im Folgenden als „direkte Transduktion“ bezeichnet. Somit waren die Viren doppelt so lange auf den Zellen und das Medium musste seltener gewechselt werden, wodurch weniger Zellen beim Medienwechsel vom Deckglas gespült wurden. Die Granula der Zellen, die direkt transduziert wurden, zeigten durchschnittlich eine stärkere Fluoreszenzintensität als solche, die mit der bis dahin üblichen Methode transduziert worden waren.

Unter Kontrollbedingungen, mit durchgehend 5 mM Glucose, war ein deutlicher Unterschied zwischen normal transduzierten und direkt transduzierten Beta-Zellen zu erkennen. Die Granula der direkt transduzierten Zellen wurden im Verlauf des Versuchs auf ca. 70 % des Anfangswertes verringert, während die Granula in den „konventionell“ transduzierten Beta-Zellen auf 50 % reduziert wurden. Diese Tendenz war auch bei der Total Granule Number zu beobachten. Außerdem zeigten die Granula der direkt transduzierten Beta-Zellen einen verringerten Granula-Turnover (**Abbildung 5.4A**). Ein möglicher Grund für dieses Verhalten könnte das unterschiedliche Alter der Granula sein. Bei der normalen Transduktion haben die fluoreszierenden Granula ein Alter von maximal 48 Stunden, während die fluoreszierenden Granula in direkt transduzierten Zellen bis zu 72 Stunden alt sein können. Auch die höhere Fluoreszenzintensität der Granula in direkt transduzierten Zellen kann einen Einfluss haben. Die höheren Fluoreszenzintensitäten können darauf zurückzuführen sein, dass in den direkt transduzierten Zellen mehr fluoreszierendes Material produziert werden konnte. Alternativ können die Granula in den direkt transduzierten Zellen auch im Mittel näher an der Plasmamembran lokalisiert sein oder einen höheren intragranulären pH-Wert haben. Die

Lokalisation und der pH-Wert in den Granula könnten wiederum ein Hinweis auf ein unterschiedliches Alter der Granula-Populationen sein. Zudem würde auch die verringerte Mobilität der direkt transduzierten Granula für einen Alterseffekt sprechen, da von SOLIMENA ET AL gezeigt wurde, dass ältere Insulin-Granula eine geringere Mobilität an der Plasmamembran aufweisen (222).

Es war überraschend, dass die in der Kontrolle beobachteten Unterschiede zwischen den beiden Transduktionsmethoden verschwanden, wenn ein Glucose-Stimulus verwendet wurde (**Abbildung 5.4B**). Dieses Verhalten könnte aber auch weitere Hinweise liefern, wie die Unterschiede in der Kontrolle zustande kamen. Denn wenn der pH-Wert der Granula oder generell das Alter der Granula als Grund für die Unterschiede in der Kontrolle angenommen werden, wäre auch die Angleichung der Messungen in Gegenwart eines Glucose-Stimulus zu erklären. So führt die Stimulation mit Glucose zu einem Absenken des pH-Wertes in den Granula, was zu einer Angleichung der Fluoreszenzintensitäten der Granula bei beiden Transduktionsmethoden führen könnte (252). Außerdem wird durch einen Glucose-Stimulus der Anteil der jüngeren Granula an der Plasmamembran erhöht, da diese vermehrt an die Plasmamembran rekrutiert werden um freigesetzt zu werden. Dadurch würde sich im Durchschnitt das Alter der Granula an der Plasmamembran beider Transduktionsmethoden angleichen (222). Es wäre auch interessant zu wissen ob sich der intragranuläre pH-Wert bei älteren Granula wieder erhöht, da dann beide Modelle, sowohl Alter als auch pH-Wert der Granula zusammen zu dem beobachteten Effekt beitragen würden.

Diese Versuche zeigen, dass auch die Transduktionsmethode einen Einfluss auf das beobachtete Verhalten der Granula haben kann. Insofern können gut reproduzierbare Ergebnisse nur von solchen Zellen erwartet werden, die auf die gleiche Weise transduziert wurden.



**Abbildung 5.4: Einfluss der Transduktionsmethode auf die Anzahl und Mobilität der im submembranären Raum detektierten Insulin-Granula primärer Beta-Zellen**

Die Beta-Zellen wurden mit hIns-EGFP entweder mit der „klassischen“ Methode ein Tag nach der Isolierung (**Schwarze Linie**) oder mit der „alternativen“ Methode am Tag der Isolierung (**Graue Linie**) transduziert. Dabei wurden sowohl die Kontrollperfusionen (**A**) als auch die Testperfusionen (**B**) miteinander verglichen. Am Tag

der Messung wurden die Zellen 30 Minuten mit Krebs-Ringer-Lösung umströmt. Wobei die Glucose-Konzentration in den Testperfusionen von Minute 10 – 20 von 5 mM auf 15 mM und von Minute 20 – 30 weiter auf 30 mM erhöht wurde. Währenddessen wurden an 6 repräsentativen Zeitpunkten Sequenzen von 200 Bildern aufgenommen. Dargestellt sind die Anzahl der Granula im ersten Bild, die Gesamtzahl der Granula in der Sequenz, die Short-Term Resident Granules und die Arriving Granules. Es ist jeweils der Mittelwert + SEM aus 5 Versuchen angegeben.

### **5.2.3 Parallele Markierung der Insulin-Granula und des Aktin-Zytoskeletts**

Das Aktin-Zytoskelett wurde schon früh mit der Dynamik und der Exozytose von Granula in Verbindung gebracht (253,254). Frühe Untersuchungen an Chromaffin-Zellen schrieben dem Aktin eine Barriere-Funktion zu. Dies basierte auf der Beobachtung eines Aktin-Walls, der die Zelle in der Epi-Fluoreszenz umgab und der durch die Verwendung von Toxinen, die zur Depolymerisation von Aktin führten, zerstört wurde (188). Die gleichen Beobachtungen konnten auch in Beta-Zelllinien gemacht werden (255,191,185) und decken sich auch mit unseren Beobachtungen (siehe: Kapitel 4.2.5). Dazu kommt die Beobachtung, dass die Behandlung mit F-Aktin depolymerisierenden Toxinen zu einer Erhöhung der Insulin-Sekretion führte (190).

Allerdings gab es auch Untersuchungen, die die Rolle des Aktins als reine Barriere gegen die Exozytose in Zweifel zogen. So konnte auch mit einem F-Aktin stabilisierenden Toxin, dem Jaspakinolide, in manchen Studien eine Verringerung der Insulin-Sekretion (256) beziehungsweise der Granula-Fusion (187) beobachtet werden. In anderen Studien war jedoch eine Erhöhung der Insulin-Sekretion zu beobachten (185,257,186). Das führte zur Formulierung des aktuellen Modells, das Aktin eine doppelte Rolle in der Exozytose zuschreibt: zum einen als Barriere gegen die unkontrollierte Freisetzung und zum anderen als Transportstruktur um die Granula zur Plasmamembran zu transportieren (192,257). Die Regulation soll dabei über einen dynamischen Auf- und Abbau des Aktins, dem sogenannten Aktin-Remodelling, erfolgen, welcher durch Nährstoffstimuli, oder deren Metaboliten, vermittelt wird (129,189).

Dazu passend konnten wir im TIRF-Modus an den doppelt transduzierten Zellen einige Hinweise finden, die zeigen, dass das Aktin-Zytoskelett sich näher an der Plasmamembran befindet als die Granula im TIRF-Feld. So ließ sich durch das Abflachen des TIRF-Winkels, was zu einer verringerten Eindringtiefe der Fluoreszenzanregung führte, die Fluoreszenzintensität der Granula deutlich senken, während diejenige des Aktins fast unverändert blieb. Außerdem war festzustellen, dass das Aktin-Zytoskelett mit maximaler Schärfe dargestellt wurde, wenn das Objektiv weiter vom Deckgläschen entfernt war und

umgekehrt die Insulin-Granula nur dann mit maximaler Schärfe dargestellt werden konnten, wenn der Abstand vermindert wurde. Insulin Granula und subcorticale Aktinfasern liegen also nicht genau in einer Ebene (siehe: Kapitel 4.2.3).

Wir konnten außerdem zeigen, dass neben Latrunculin auch ein 15 mM Glucose-Stimulus zu Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts in Beta-Zellen führte. Die Veränderungen waren sowohl in der Epi-Fluoreszenz als auch im TIRF-Modus sichtbar (siehe: Kapitel 4.2.5). Die meisten Untersuchungen des Aktin-Zytoskeletts wurden bisher mit Toxinen durchgeführt, die, wie bereits beschrieben, einen Einfluss auf das F-Aktin und auch auf die Exozytose haben. SPEKTOR ET AL. haben verschiedene solcher Toxine mit ihrer Struktur und den Wirkmechanismen zusammengestellt (258). Für uns relevant war zunächst das Latrunculin, da sowohl der molekulare Wirkmechanismus am Aktin (259) als auch seine Wirkung auf die Insulin-Sekretion (191,185) bereits beschrieben waren. Das Latrunculin stabilisiert das monomere G-Aktin und verhindert so die Polymerisierung zum F-Aktin. Dadurch kann F-Aktin abgebaut, aber nicht wieder aufgebaut werden. Da der Auf- und Abbau aber ein dynamischer, ständig stattfindender Prozess ist, kommt es so zu einem kontinuierlichen Abbau des F-Aktins. Ein anderes häufig verwendetes Toxin ist das Phalloidin. Dieses wird allerdings eher zur Färbung des Aktins verwendet, indem es an fluoreszierende Moleküle gekoppelt wird, da es F-Aktin sehr stabil bindet. Es wird häufig für die Aktin-Färbung in fixierten Zellen verwendet (260). Für die dynamische Markierung von Aktin in lebenden Zellen ist es allerdings weniger geeignet, da es zum einen nicht zellpermeabel ist und zum anderen die Dynamik des Aktins beeinflusst (261,262). Für die dynamische Untersuchung des Aktins werden Fusionsproteine verwendet. Das kann entweder Aktin-GFP sein oder kurze Aktin-bindende Domänen anderer Proteine, die ebenfalls an ein fluoreszierendes Protein fusioniert werden. Beispiele hierfür sind die Aktin-bindenden Peptide Utr230 und Utr261, die aus dem Protein Urotropin stammen (263), F-Tractin, das aus der Inositol-1,4,5-Trisphosphate-3-Kinase A stammt (264) und Lifeact, das aus den ersten 17 Aminosäuren des Proteins ABP 140 besteht (174). Bei einem Vergleich wurde die beste Färbung der Aktin-Strukturen in verschiedenen Zellen mit Lifeact und F-Tractin erreicht (265). Wir haben das Lifeact verwendet, da es bisher nur in der Bierhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) nachgewiesen werden konnte und auch keine homologen Sequenzen in anderen Organismen bekannt sind. Dadurch können Wechselwirkungen oder eine Konkurrenz im Bindungsverhalten mit anderen zelleigenen Proteinen am besten ausgeschlossen werden (174). Das Lifeact wurde an RFP (Rot Fluoreszierendes Protein) fusioniert, da so die parallele Darstellung des Aktins mit den Granula, die mit hIns-EGFP markiert wurden, möglich war.

Obwohl in den letzten Jahren eine Vielzahl an Werkzeugen entwickelt worden sind, um Aktin zu markieren ohne dessen dynamischen Umbau zu stören, gibt es nur ansatzweise quantitative Analysen des Aktin-Zytoskeletts. Die einzige Quantifizierung, die bisher in Beta-Zellen durchgeführt wurde, ist die Beschreibung des Aktin-Walls in der Epi-Fluoreszenz. Die Strukturen, die in der TIRF-Mikroskopie sichtbar werden, sind allerdings deutlich komplexer und schwerer zu quantifizieren. Daher wurde bei der Auswertung von TIRF-Bildern, die das kortikale Aktin zeigen, auf die Beschreibung einzelner Bilder zurückgegriffen (223,266). Die große Heterogenität des kortikalen Aktins, die wir in der einzelnen Beta-Zellen beobachten konnten (siehe: **Abbildung 4.18**), macht die Beschreibung einzelner Bilder allerdings zu einem Problem, da so das Ergebnis stark von der Auswahl der Zelle abhängen kann. Das erhöht die Gefahr einer verzerrten Darstellung (Selektions-Bias).

Es war erkennbar, dass sich nach Stimulation mit 30 mM Glucose die Fluoreszenz der submembranären Granula und des kortikalen Aktins an unterschiedlichen Stellen konzentrierte (siehe: **Abbildung 4.19**). Es gelang, diese subjektive Wahrnehmung mittels eines an der Zellgrenze verlaufenden Intensitätsprofils darzustellen. Es gelang jedoch nicht, die örtliche Unterschiedlichkeit in einem numerischen Wert anzugeben, der sich entsprechend der Stimulationssituation der Zelle ändert (siehe: **Abbildung 4.20**). Dass dieses Problem tatsächlich noch nicht gelöst ist, zeigt sich auch daran, dass in einer kürzlich erschienenen Publikation eine indirekte Methode zur quantitativen Beschreibung des Aktins in Beta-Zellen verwendet wurde (220), deren Informationsgewinn jedoch nicht optimal ist.



### 5.3 Dynamische Bestimmung der ATP/ADP-Ratio in MIN6-Zellen und primären Beta-Zellen mittels PercevalHR

ATP ist ein wichtiger Faktor für die Kopplung des Glucose-Metabolismus mit dem *Triggering Pathway* der Insulin-Sekretion. ATP ist ebenfalls im Gespräch die amplifizierenden Signale eines Glucose-Stimulus vermitteln zu können (*Amplifying Pathway*) (90). Bisher wurden viele Untersuchungen der cytosolischen ATP-Konzentration mit Endpunktmessungen durchgeführt. Hierfür werden die Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt lysiert und die ATP-Konzentrationen indirekt bestimmt, wobei der Nachweis des ATP mit der Luciferase-Reaktion erfolgt (267). Dabei katalysiert die Luciferase die Reaktion von Luciferin mit Sauerstoff zu Oxyluciferin, welches phosphoresziert und so spektroskopisch detektiert werden kann (268). Das ATP dient dabei als Kofaktor und wird verbraucht. Um mit dieser Technik die Ratio aus ATP und ADP zu bestimmen, muss neben der Bestimmung der ATP-Konzentration in einer Hälfte der Probe das ADP enzymatisch zu ATP umgewandelt werden, um darin auch die Gesamtmenge von ATP und ADP zu bestimmen. Die ADP-Konzentration ergibt sich aus der Differenz aus ATP und der Gesamtmenge der Adenin-Nucleotide (99, 100). Die Anzahl der Reaktionsschritte verringert allerdings die Präzision der Messmethode. Außerdem sind dynamische Untersuchungen mit diesem Verfahren nicht möglich. Es wurden zwar schon Messungen mit Luciferase sowohl in Beta-Zellen (269) als auch in einer Alpha-Zelllinie (270) durchgeführt, in denen die Luciferase per viraler Transduktion in die Zellen gebracht wurde. Allerdings ist bei diesen Einzelzell-Messungen die Lichtintensität so gering, dass spezielle Kameras verwendet werden müssen (271). Der Verbrauch des ATP durch die Luciferase ist ein weiteres Problem, wenn dynamische Messungen durchgeführt werden sollen.

Es sind mittlerweile eine Vielzahl von Methoden entwickelt worden um die cytosolische ATP-Konzentration oder auch die ATP/ADP-Ratio *in vitro* und *in vivo* zu bestimmen (272). Die besten Kandidaten für Messungen *in vivo* sind momentan die FRET-basierten ATeam-Sensoren (273,274) und das PercevalHR, das auf einem zirkulär permutierten YFP basiert (183). Das Perceval (180), aus dem der PercevalHR-Sensor entstand, wurde von der Gruppe um RUTTER bereits verwendet um die cytosolische ATP/ADP-Ratio in Beta-Zellen zu bestimmen (275). Wir haben unsere Messungen mit dem PercevalHR durchgeführt, da die dynamische Breite dieses Sensors den Bereich der ATP/ADP-Ratio, den man für gesunde Zellen annehmen kann, deutlich besser abdeckt als der Vorgänger Perceval (175). Die Fluoreszenzintensität von PercevalHR hängt, wie bei allen zirkulär permutierten fluoreszierenden Proteinen, vom pH-Wert ab. Da häufig verwendete Stimuli wie 40 mM KCl oder 30 mM Glucose zu

Veränderungen des cytosolischen pH-Wertes führen, mussten die Messungen für den pH-Wert korrigiert werden (276,277). Das kann sowohl mit genetisch kodierten pH-Sensoren (278) als auch, wie in dieser Arbeit, mit einem pH-Sensormolekül wie SNARF (180) durchgeführt werden.

In unseren Versuchen konnten wir zunächst prinzipiell zeigen, dass die Dynamik der ATP/ADP-Ratio mit PercevalHR sowohl in MIN6-Zellen als auch in einzelnen Beta-Zellen zu bestimmen ist. Die MIN6-Zellen wiesen bei den Messungen zum Teil, je nach Präparation, deutliche Unterschiede in ihrer Reaktion auf einen Glucose-Stimulus auf. Das zeigt, dass besonders bei der Untersuchung metabolischer Fragestellungen mit Zelllinien Vorsicht geboten ist. Auch bei den Beta-Zellen gab es Unterschiede hinsichtlich verschiedener Zellpräparationen, diese waren allerdings deutlich geringer. Dennoch zeigt auch dieser Befund generell, dass Messungen an Beta-Zellen, in denen verschiedene Stimuli oder Bedingungen miteinander verglichen werden, zeitlich nah beieinander liegen sollten. Ideal ist es, alle Bedingungen innerhalb einer Zellpräparation miteinander vergleichen zu können.

Wie zu erwarten war, hat ein auf die Sekretion maximal effektiver 30 mM Glucose-Stimulus sowohl in MIN6-Zellen als auch in einzelnen Beta-Zellen zu einer Erhöhung der ATP/ADP-Ratio geführt. Eine Depolarisation mit 40 mM KCl führte hingegen zu einer Senkung der ATP/ADP-Ratio. Die Stimulation mit 10 mM KIC, die ebenfalls auf der Ebene der Sekretion maximal effektiv ist, führte, verglichen mit dem Glucose-Stimulus, nur zu einer schwachen transienten Erhöhung der ATP/ADP-Ratio, obwohl die durch 10 mM KIC ausgelöste Sekretion mindestens so hoch ist wie die, die durch 30 mM Glucose ausgelöst wird (279). Möglicherweise ist der anfängliche Anstieg der ATP/ADP-Ratio mit 10 mM KIC ausreichend um die  $K_{ATP}$ -Kanäle der Beta-Zelle zu schließen und den *Triggering Pathway* zu aktivieren. Die weitere Sekretionssteigerung lässt sich vermutlich durch amplifizierende Signale erklären, die entweder nicht durch ATP vermittelt werden, oder auf der Produktion von ATP basieren, welches allerdings direkt wieder verbraucht wird, um amplifizierende Prozesse auszulösen.

In Zukunft wäre es interessant zu untersuchen, ob sich die mit PercevalHR gemessenen ATP/ADP-Ratiowerte in einen Zusammenhang mit den vorher gemessenen Ergebnissen aus den Luciferase-Assays bringen ließen (279). Ein weiterer interessanter Ansatz könnte außerdem sein das PercevalHR mit einem Membrananker, beispielsweise für die Granulum-Membran, zu versehen um auf diese Weise die lokale ATP/ADP-Ratio in direkter Umgebung der Granula zu untersuchen. Hierzu gibt es bereits Versuche mit den ATeam-Sensoren (280).

## 6 Zusammenfassung

### 6.1 TIRF-Mikroskopische Untersuchungen der Insulin-Granula und des Aktin-Zytoskeltetts

Allgemeines Ziel der vorliegenden Arbeit ist, die Mechanismen der biphasischen Kinetik der Insulinsekretion weiter aufzuklären. Dafür wurden die Anzahl und die Mobilität der submembranären Insulin-Granula in primären Beta-Zellen aus NMRI-Mäusen untersucht. Gleichzeitig sollten die detektierten Exozytosen der Insulin-Granula in einzelnen Beta-Zellen mit der Insulinsekretion ganzer NMRI-Inseln verglichen werden. Dabei wurden die Effekte zweier unterschiedlich wirkender Sekretionsstimuli, eine maximal wirksame Kalium-Depolarisation und eine maximal wirksame Glucose-Konzentration, verglichen. Ein zentraler Aspekt war die Bewertung und Einordnung der Ergebnisse mit Hilfe bereits bestehender Daten aus MIN6-Zellen. Zusätzlich wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Stimulation mit Glucose untersucht indem eine maximal wirksame Glucose-Konzentration mit einer annähernd physiologischen Glucose-Konzentration verglichen wurde. Während dieser Messungen wurde auch die Struktur des Aktin-Zytoskeletts sowie dessen Lagebeziehung zu den Insulin-Granula betrachtet. So konnte auch der Einfluss stimulierender Glucose-Konzentrationen auf das Aktin-Zytoskelett untersucht werden.

Für die Untersuchungen wurden die folgenden experimentellen Verfahren eingesetzt: 1. die Messung der Insulinsekretion mittels Perifusion und ELISA, 2. die Messung der cytosolischen Calciumkonzentration mit dem Indikator Fura-2 LeakRes, 3. die Erfassung von Anzahl, Mobilität und Exozytosen von fluoreszierend markierten Insulin-Granula und die Beobachtung der Struktur und Dynamik des Aktin-Zytoskeletts durch TIRF-mikroskopische Messungen. Die Messung der cytosolischen Calciumkonzentration diente vor allem als Kontrolle, dass die virale Transduktion der Zellen und die Fluoreszenzanregung während der TIRF-Messungen nicht zu Beeinträchtigungen des physiologischen Reaktionsmusters führen, wodurch die Aussagekraft der TIRF-mikroskopischen Messungen in Frage gestellt worden wäre.

Ein Ziel der TIRF-mikroskopischen Untersuchungen der Granula in den Beta-Zellen war die Überprüfung der vorherigen Ergebnisse mit den MIN6-Zellen, da die primären Beta-Zellen hinsichtlich des Glucose-Metabolismus ein der Physiologie näheres Modell darstellen. Hinzu kam die Überprüfung unerwarteter Ergebnisse aus früheren Untersuchungen an MIN6-Zellen, wie die fehlende Erhöhung der Exozytoseraten während der Einwirkung insulinotroper Stimuli. Gleichzeitig war es das Ziel, durch den Einsatz unterschiedlicher Granulum-Label (hIns-EGFP,

mIns-C-emGFP) zu prüfen, ob die gemessene Dynamik der Granula durch die Art des verwendeten Fluoreszenzlabels beeinflusst wird.

Bei den Untersuchungen der Granula in einzelnen Beta-Zellen zeigte sich, dass die Ergebnisse bezüglich der Zahl und der Dynamik der Granula, mit den beiden Granula-Labeln hIns-EGFP und mIns-C-emGFP sehr ähnlich waren und deshalb Mittelwerte aus den Versuchen beider Label produziert werden konnten. Der Einsatz von 40 mM KCl als erstem Stimulus erhöhte den Granula-Turnover leicht während sowohl 15 mM als auch 30 mM Glucose den Granula-Turnover gleichermaßen verringerten. Das weist darauf hin, dass in der Steigerung der Insulinsekretion durch starke Kaliumdepolarisation noch andere Mechanismen aktiviert werden als in der Glucose-induzierten Insulinsekretion. Die verlängerte Verweildauer der Granula an der Plasmamembran durch Stoffwechselstimuli wie Glucose könnte die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass die Granula mit der Membran fusionieren. Im Gegensatz dazu führten beide Stimuli in MIN6-Zellen zu einer Erhöhung des Granula-Turnover. Eine Parallele zwischen MIN6-Zellen und Beta-Zellen war allerdings die geringe Anzahl beobachteter Exozytosen, die sich auch während der Phasen der Stimulation mit 40 mM KCl oder 30 mM Glucose nicht steigern ließen. Mögliche Gründe für diese Beobachtung können eine zu restriktiver Detektionsalgorithmus in der Bildauswertung oder ein Filtereffekt der Fusionspore sein, wodurch die Freisetzung des großen Insulin-EGFP-Moleküls behindert wird, oder schließlich die nicht-physiologische Einzelzellexistenz der isolierten Beta-Zellen.

Die Betrachtung der Struktur und Dynamik des Aktin-Zytoskeletts war interessant, weil das Aktin-Zytoskelett einen Einfluss auf die Dynamik und die Exozytose der Insulin-Granula haben soll. Ein Ziel unserer Messungen war es, die räumliche Lagebeziehung von Granula und Aktin darzustellen um, speziell in einzelnen Beta-Zellen, den möglichen Einfluss des Aktins auf die Insulin-Granula einschätzen zu können. Ein weiteres Ziel war die Quantifizierung dieser Lagebeziehung.

In diesen Versuchen wiesen einige Beobachtungen darauf hin, dass sich das kortikale Aktin-Netzwerk näher an der Plasmamembran befindet als die submembranären Insulin-Granula. Aufschlussreich war die Beobachtung, dass das kortikale Aktin-Netzwerk an den Stellen der Membran, die dem umströmenden Medium zugewandt sind, dichter ist als an Stellen, an denen die Beta-Zelle Kontakt mit benachbarten Zellen hat. Dies könnte eine Erklärung für die geringen beobachteten Exozytoseraten in einzelnen Beta-Zellen sein. Es gelang in dieser Arbeit zwar einen räumlichen Zusammenhang zwischen Aktin und Insulin-Granula zu beschreiben, dieser ließ sich allerdings nicht in einen numerischen Wert kondensieren, der sich während der

Stimulation mit Glucose ändert. Eine solche Art der Quantifizierung von Aktin-Strukturen ist bisher noch nicht beschrieben worden, könnte aber bei der Aufklärung der Rolle des Aktin-Zytoskeletts in der Insulinsekretion entscheidend wichtig sein.

Zusammenfassend weisen die Befunde auf einige generelle Unterschiede zwischen MIN6-Zellen und Beta-Zellen hin. Außerdem sprechen die Ergebnisse dafür, dass einzelne Beta-Zellen kein optimales Modell darstellen, zumindest wenn die Exozytoserate in Beziehung zur Sekretionsrate intakter Inseln gesetzt werden soll. Die Untersuchung der Exozytose von Insulin-Granula an Beta-Zellen innerhalb von Inseln oder größeren Beta-Zellclustern könnte eine Lösung für dieses Problem sein.

## **6.2 Untersuchung der ATP/ADP-Ratio mit PercevalHR**

In einem Nebenprojekt wurde die dynamische Messung der ATP/ADP-Ratio in Einzelzellen etabliert. Dieser Parameter ist zunächst für die Auslösung der Depolarisation im Rahmen der Nährstoffstimulation interessant, kann aber auch für die Energieabhängigkeit der Exozytose von Bedeutung sein. In diesen Versuchen stand der Vergleich von MIN6-Zellen und Beta-Zellen im Vordergrund. Außerdem wurde der Einfluss verschiedener Stimuli auf die ATP/ADP-Ratio untersucht. Die Messung der ATP/ADP-Ratio wurde mittels PercevalHR und die parallele pH-Korrektur mit dem pH-Indikator SNARF durchgeführt. Ein großer Vorteil dieses Verfahrens ist, dass mit PercevalHR dynamische Messungen möglich sind und die Zellen nicht an einem Zeitpunkt vor der Messung lysiert werden müssen.

In diesen Versuchen zeigte sich, dass eine dynamische und pH-bereinigte Darstellung der ATP/ADP-Ratio mit PercevalHR und SNARF prinzipiell sowohl in MIN6-Zellen als auch in primären Beta-Zellen möglich ist. Generell reagierten MIN6-Zellen und Beta-Zellen beide mit einer Steigerung der ATP/ADP-Ratio wenn ein Glucose-Stimulus verwendet wurde. Die ATP/ADP-Ratio sank erst mit dem Auswaschen des Glucose-Stimulus wieder auf prästimulatorische Werte. Allerdings waren in beiden Zellarten Unterschiede in der Reaktion auf die Stimulation mit Glucose zu sehen. Diese Unterschiede traten allerdings nicht innerhalb einer Zell-Präparation auf und waren bei MIN6-Zellen sehr viel deutlicher als bei Beta-Zellen. Es war auch möglich Unterschiede zwischen verschiedenen Stimuli dazustellen. So führte der Einsatz eines rein depolarisierenden Stimulus wie KCl zu einer Verringerung der ATP/ADP-Ratio. Die Verwendung eines weiteren metabolischen Stimulus, der alpha-Ketoisocapronsäure

(KIC), führte wie Glucose zu einer Erhöhung der ATP/ADP-Ratio. Diese war allerdings transient und sank bereits vor Beginn des Auswaschens wieder.

Zusammenfassend können dynamische Untersuchungen der ATP/ADP-Ratio mit PercevalHR an Einzelzellen durchgeführt werden. Die primären Beta-Zellen sind dabei das bessere Modell für diese Untersuchungen, da sie sich auf metabolischer Ebene Physiologie-näher verhalten und auch besser reproduzierbare Ergebnisse liefern. Dennoch sollten vergleichende Untersuchungen auch an Beta-Zellen innerhalb eines kurzen Zeitraums durchgeführt werden. Idealerweise sollten unterschiedliche Versuchsbedingungen direkt innerhalb einer Zell-Präparation verglichen werden. Zukünftige Untersuchungen sollten belegen, ob es eine feste Beziehung zwischen der mit PercevalHR gemessenen ATP/ADP-Ratio und der mittels der Luciferase- Methode gemessenen ATP/ADP-Ratio gibt.

## Literaturverzeichnis

1. Vaupel, P., Schaible, H.-G., and Mutschler, E. (2015) Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. 7th ed., WVG Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
2. Barach, J. H. (1952) Paul Langerhans 1847-1888, *Diabetes* 1, 411–413.
3. Rahier, J., Goebbels, R. M., and Henquin, J. C. (1983) Cellular composition of the human diabetic pancreas, *Diabetologia* 24, 366–371.
4. Stefan, Y., Orci, L., Malaisse-Lagae, F., Perrelet, A., Patel, Y., and Unger, R. H. (1982) Quantitation of endocrine cell content in the pancreas of nondiabetic and diabetic humans, *Diabetes* 31, 694–700.
5. Sanger, F. (1945) The Free Amino Groups of Insulin, *Biochem. J.* 39, 507–515.
6. Sanger, F. (1949) The Terminal Peptides of Insulin, *Biochem. J.* 45, 563–574.
7. Ryle, A.P., Sanger, F., Smith, L.F., Kitai, R. (1955) The Disulphide Bonds of Insulin, *Biochem. J.* 60, 541–556.
8. Haeusler, R. A., McGraw, T. E., and Accili, D. (2018) Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling, *Nature reviews. Molecular cell biology* 19, 31–44.
9. Hubbard, S. R. (2013) The insulin receptor: both a prototypical and atypical receptor tyrosine kinase, *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5, a008946.
10. Huang, C., Thirone, A. C. P., Huang, X., and Klip, A. (2005) Differential contribution of insulin receptor substrates 1 versus 2 to insulin signaling and glucose uptake in 16 myotubes, *The Journal of biological chemistry* 280, 19426–19435.
11. Petersen, M. C., and Shulman, G. I. (2018) Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance, *Physiological reviews* 98, 2133–2223.
12. Leto, D., and Saltiel, A. R. (2012) Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4, *Nature reviews. Molecular cell biology* 13, 383–396.
13. Watson, R. T., Kanzaki, M., and Pessin, J. E. (2004) Regulated membrane trafficking of the insulin-responsive glucose transporter 4 in adipocytes, *Endocrine reviews* 25, 177–204.

14. Shulman G. I., Rothman D. L., Jue T., Stein P., DeFronzo R. A., Shulman, R. G. (1990) Quantitation of Muscle Glycogen Synthesis in Normal Subjects and Subjects with Non-Insulin-Dependent Diabetes by  $^{13}\text{C}$  Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, *The New England journal of medicine* 322, 223–228.
15. Villar-Palasi C, L. J. (1960) Insulin-mediated effect on the activity of UDPG-glycogen transglucosylase of muscle, *Biochim. Biophys. Acta* 39, 171–173.
16. Zhang, J., Hiken, J., Davis, A. E. , Lawrence, J. C. (1989) Insulin Stimulates Dephosphorylation of Phosphorylase in Rat Epitrochlearis Muscle, *The Journal of biological chemistry* 264, 17513–17523.
17. Kersten, S. (2001) Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis, *EMBO reports* 2, 282–286.
18. Perry, R. J., Camporez, J.-P. G., Kursawe, R., Titchenell, P. M., Zhang, D., Perry, C. J., Jurczak, M. J., Abudukadier, A., Han, M. S., Zhang, X.-M., Ruan, H.-B., Yang, X., Caprio, S., Kaech, S. M., Sul, H. S., Birnbaum, M. J., Davis, R. J., Cline, G. W., Petersen, K. F., and Shulman, G. I. (2015) Hepatic acetyl CoA links adipose tissue inflammation to hepatic insulin resistance and type 2 diabetes, *Cell* 160, 745–758.
19. Gould, G. W., Thomas, H. M., Jess, T. J., Bell, G. I. (1991) Expression of human glucose transporters in *Xenopus* oocytes: kinetic characterization and substrate specificities of the erythrocyte, liver, and brain isoforms, *Biochemistry* 30, 5139–5145.
20. Bollen, M., Keppens, S., Stalmans, W. (1998) Specific features of glycogen metabolism in the liver, *Biochem. J.* 336, 19–31.
21. Petersen, K. F., Laurent, D., Rothman, D. L., Cline, G. W., and Shulman, G. I. (1998) Mechanism by which glucose and insulin inhibit net hepatic glycogenolysis in humans, *The Journal of clinical investigation* 101, 1203–1209.
22. Cohen, P., Nimmo, H. G., and Proud, C. G. (1978) How does insulin stimulate glycogen synthesis?, *Biochemical Society symposium*, 69–95.
23. Li, S., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (2010) Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 3441–3446.



24. Ma, X. M., and Blenis, J. (2009) Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control, *Nature reviews. Molecular cell biology* 10, 307–318.
25. Roden, M. (2016) Diabetes mellitus - Definition, Klassifikation und Diagnose, *Wiener klinische Wochenschrift* 128, S37–S40.
26. Nauck, M., Petersmann, A., Müller-Wieland, D., Schleicher, E., Müller, U., Landgraf, R., Freckmann, G., and Heinemann, L. (2018) Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus, *Diabetologie und Stoffwechsel* 13, S90-S96.
27. American Diabetes Association (2015) Classification and diagnosis of diabetes, *Diabetes care* 38, S8-S16.
28. Prentki, M., and Nolan, C. J. (2006) Islet beta cell failure in type 2 diabetes, *The Journal of clinical investigation* 116, 1802–1812.
29. Poitout, V., Robertson, R. P. (2002) Minireview: Secondary  $\beta$ -Cell Failure in Type 2 Diabetes—A Convergence of Glucotoxicity and Lipotoxicity, *Endocrinology* 134, 339–342.
30. Butler, A. E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R. A., and Butler, P. C. (2003) Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes, *Diabetes* 52, 102–110.
31. Rahier, J., Guiot, Y., Goebbels, R. M., Sempoux, C., and Henquin, J. C. (2008) Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes, *Diabetes, obesity & metabolism* 10 Suppl 4, 32–42.
32. Rustenbeck, I., Baltrusch, S., and Tiedge, M. (2010) Do insulintropic glucose-lowering drugs do more harm than good? The hypersecretion hypothesis revisited, *Diabetologia* 53, 2105–2111.
33. Reaven, G. M. (1988) Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease, *Diabetes* 37, 1595–1607.
34. Reaven, G. M. (2005) Insulin resistance, the insulin resistance syndrome, and cardiovascular disease, *Panminerva medica* 47, 201–210.
35. Aston-Mourney, K., Proietto, J., Morahan, G., and Andrikopoulos, S. (2008) Too much of a good thing: why it is bad to stimulate the beta cell to secrete insulin, *Diabetologia* 51, 540–545.

36. Turner, R. C., Cull, C. A., Frighi, V., and Holman, R. R. (1999) Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group, *JAMA* 281, 2005–2012.
37. Kahn, S. E., Haffner, S. M., Heise, M. A., Herman, W. H., Holman, R. R., Jones, N. P., Kravitz, B. G., Lachin, J. M., O'Neill, M. C., Zinman, B., and Viberti, G. (2006) Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy, *The New England journal of medicine* 355, 2427–2443.
38. Lortz, S., Gurgul-Convey, E., Lenzen, S., and Tiedge, M. (2005) Importance of mitochondrial superoxide dismutase expression in insulin-producing cells for the toxicity of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines, *Diabetologia* 48, 1541–1548.
39. Eizirik, D. L., Cardozo, A. K., and Cnop, M. (2008) The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus, *Endocrine reviews* 29, 42–61.
40. Efanova, I. B., Zaitsev, S. V., Zhivotovsky, B., Köhler, M., Efendic, S., Orrenius, S., Berggren, P. O. (1998) Glucose and Tolbutamide Induce Apoptosis in Pancreatic b-Cells. A process dependent on intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration, *The Journal of biological chemistry* 273, 33501–33507.
41. Maedler, K., Carr, R. D., Bosco, D., Zuellig, R. A., Berney, T., and Donath, M. Y. (2005) Sulfonylurea induced beta-cell apoptosis in cultured human islets, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90, 501–506.
42. Remedi, M. S., Nichols, C. G. (2008) Chronic Antidiabetic Sulfonylureas In Vivo: Reversible Effects on Mouse Pancreatic b-Cells, *PloS Medicine* 5, 1473–1485.
43. Schauder, P., Arends, J., Frerichs, H. (1977) Onset and Reversibility of Changes in Secretory Function and Composition of Isolated Rat Pancreatic Islets Following Long-Term Administration of High or Low Tolbutamide Doses, *Metabolism* 26, 9–15.
44. Rustenbeck, I., Krautheim, A., Jörns, A., and Steinfelder, H. J. (2004) Beta-cell toxicity of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel-blocking insulin secretagogues, *Biochemical pharmacology* 67, 1733–1741.
45. Nauck, M. A., Heimesaat, M. M., Ørskov, C., Holst, J. J., Ebert, R., Creutzfeldt, W. (1993) Preserved Incretin Activity of Glucagon-like Peptide 1 [7-36 Amide] but Not of Synthetic

Human Gastric Inhibitory Polypeptide in Patients with Type-2 Diabetes Mellitus, *J. Clin. Invest.* 91, 301–307.

46. Doyle, M. E., Egan, J. M. (2007) Mechanisms of Action of GLP-1 in the Pancreas, *Pharmacol Ther.* 113, 546–593.

47. Grill, V., Björklund, A. (1999) Overstimulation and Beta-Cell Function, *Diabetes* 50, S122–S124.

48. Radtke, M., Kollind, M., Qvigstad, E., and Grill, V. (2007) Twelve weeks' treatment with diazoxide without insulin supplementation in Type 2 diabetes is feasible but does not improve insulin secretion, *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 24, 172–177.

49. Ingo Rustenbeck (2002) Desensitization of insulin secretion, *Biochemical pharmacology* 63, 1921–1935.

50. Perry, J. R. B., and Frayling, T. M. (2008) New gene variants alter type 2 diabetes risk predominantly through reduced beta-cell function, *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 11, 371–377.

51. Stadler, M., Pacini, G., Petrie, J., Luger, A., and Anderwald, C. (2009) Beta cell (dys)function in non-diabetic offspring of diabetic patients, *Diabetologia* 52, 2435–2444.

52. Ferrannini, E., and Mari, A. (2014)  $\beta$ -Cell function in type 2 diabetes, *Metabolism: clinical and experimental* 63, 1217–1227.

53. Talchai, C., Xuan, S., Lin, H. V., Sussel, L., and Accili, D. (2012) Pancreatic  $\beta$  cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic  $\beta$  cell failure, *Cell* 150, 1223–1234.

54. Diedisheim, M., Oshima, M., Albagli, O., Hultdt, C. W., Ahlstedt, I., Clausen, M., Menon, S., Aivazidis, A., Andreasson, A.-C., Haynes, W. G., Marchetti, P., Marselli, L., Armanet, M., Chimienti, F., and Scharfmann, R. (2018) Modeling human pancreatic beta cell dedifferentiation, *Molecular metabolism* 10, 74–86.

55. Marselli, L., Suleiman, M., Masini, M., Campani, D., Bugliani, M., Syed, F., Martino, L., Focosi, D., Scatena, F., Olimpico, F., Filipponi, F., Masiello, P., Boggi, U., and Marchetti, P. (2014) Are we overestimating the loss of beta cells in type 2 diabetes?, *Diabetologia* 57, 362–365.

56. DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., Holst, J. J., Hu, F. B., Kahn, C. R., Raz, I., Shulman, G. I., Simonson, D. C., Testa, M. A., and Weiss, R. (2015) Type 2 diabetes mellitus, *Nature reviews. Disease primers* 1, 15019.
57. Coppieters, K. T., Wiberg, A., Amirian, N., Kay, T. W., and Herrath, M. G. von (2011) Persistent glucose transporter expression on pancreatic beta cells from longstanding type 1 diabetic individuals, *Diabetes/metabolism research and reviews* 27, 746–754.
58. McCulloch, L. J., van de Bunt, M., Braun, M., Frayn, K. N., Clark, A., and Gloyn, A. L. (2011) GLUT2 (SLC2A2) is not the principal glucose transporter in human pancreatic beta cells: implications for understanding genetic association signals at this locus, *Molecular genetics and metabolism* 104, 648–653.
59. Henquin, J.-C., Dufrane, D., and Nenquin, M. (2006) Nutrient control of insulin secretion in isolated normal human islets, *Diabetes* 55, 3470–3477.
60. Hedekov, C. J. (1980) Mechanism of glucose-induced insulin secretion, *Physiological reviews* 60, 442–509.
61. Matschinsky, F. M., Ellermann, J., Stillings, S., Raybaud, F., Pace, C., Zawulich, W. (1975) Hexoses and insulin secretion., Springer, Heidelberg.
62. Malaisse, W. J., Sener, A., Herchuelz, A., and Hutton, J. C. (1979) Insulin release: the fuel hypothesis, *Metabolism: clinical and experimental* 28, 373–386.
63. Nakagawa, Y., Nagasawa, M., Yamada, S., Hara, A., Mogami, H., Nikolaev, V. O., Lohse, M. J., Shigemura, N., Ninomiya, Y., and Kojima, I. (2009) Sweet taste receptor expressed in pancreatic beta-cells activates the calcium and cyclic AMP signaling systems and stimulates insulin secretion, *PloS one* 4, e5106.
64. Nelson, G., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N. J., and Zuker, C. S. (2001) Mammalian sweet taste receptors, *Cell* 106, 381–390.
65. Kyriazis, G. A., Soundarapandian, M. M., and Tyrberg, B. (2012) Sweet taste receptor signaling in beta cells mediates fructose-induced potentiation of glucose-stimulated insulin secretion, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, E524-E532.

66. Nakagawa, Y., Nagasawa, M., Mogami, H., Lohse, M., Ninomiya, Y., and Kojima, I. (2013) Multimodal function of the sweet taste receptor expressed in pancreatic  $\beta$ -cells: generation of diverse patterns of intracellular signals by sweet agonists, *Endocrine journal* 60, 1191–1206.
67. Nakagawa, Y., Ohtsu, Y., Nagasawa, M., Shibata, H., and Kojima, I. (2014) Glucose promotes its own metabolism by acting on the cell-surface glucose-sensing receptor T1R3, *Endocrine journal* 61, 119–131.
68. Malaisse, W. J., Sener, A., Mahy, M. (1974) The Stimulus-Secretion Coupling of Glucose-Induced Insulin Release. Sorbitol Metabolism in Isolated Islets, *Eur J Biochem* 47, 365–370.
69. Sener, A., Levy, J., Malaisse, W. J. (1976) The Stimulus-Secretion Coupling of Glucose-Induced Insulin Release. Does glycolysis control calcium transport in the b-cell?, *Biochem. J.* 156, 521–525.
70. Malaisse, W. J., Sener, A., Koser, M., Herchuelz, A. (1976) Stimulus-Secretion Coupling of Glucose-induced Insulin Release. Metabolism of alpha- and beta-D-glucose in isolated islets, *The Journal of biological chemistry* 251, 5936–5943.
71. Malaisse, W. J., Herchuelz, A., Levy, J., Sener, A., Pipeleers, D. G., Devis, G., Somers, G., and van Obberghen, E. (1976) The stimulus -secretion coupling of glucose-induced insulin release. XIX. The insulintropic effect of glyceraldehyde, *Molecular and cellular endocrinology* 4, 1–12.
72. Sener, A., Devis, G., Somers, G., and Malaisse, W. J. (1977) The insulintropic action of D-erythrose, *Diabetologia* 13, 125–130.
73. Malaisse, W. J., Sener, A., Koser, M., Ravazzola, M., and Malaisse-Lagae, F. (1977) The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Insulin release due to glycogenolysis in glucose-deprived islets, *Biochem. J.* 164, 447–454.
74. Antinozzi, P. A., Ishihara, H., Newgard, C. B., and Wollheim, C. B. (2002) Mitochondrial metabolism sets the maximal limit of fuel-stimulated insulin secretion in a model pancreatic beta cell: a survey of four fuel secretagogues, *The Journal of biological chemistry* 277, 11746–11755.
75. Cook, D. L., and Hales, C. N. (1984) Intracellular ATP directly blocks K<sup>+</sup> channels in pancreatic B-cells, *Nature* 311, 271–273.

76. Matschinsky, F. M. (1996) Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm, *Diabetes* 45, 223–241.
77. Chan, C. B., MacDonald, P. E., Saleh, M. C., Johns, D. C., Marban, E., and Wheeler, M. B. (1999) Overexpression of uncoupling protein 2 inhibits glucose-stimulated insulin secretion from rat islets, *Diabetes* 48, 1482–1486.
78. Chan, C. B., Saleh, M. C., Koshkin, V., and Wheeler, M. B. (2004) Uncoupling protein 2 and islet function, *Diabetes* 53, S136-S142.
79. Dean, P. M., Matthews, E. K. (1968) Electrical Activity in Pancreatic Islet Cells, *Nature* 219, 389–390.
80. Ashcroft, F. M., and Rorsman, P. (2013) K(ATP) channels and islet hormone secretion: new insights and controversies, *Nature reviews. Endocrinology* 9, 660–669.
81. Ashcroft, F. M., and Rorsman, P. (1989) Electrophysiology of the pancreatic beta-cell, *Progress in biophysics and molecular biology* 54, 87–143.
82. Rorsman, P., and Trube, G. (1985) Glucose dependent K<sup>+</sup>-channels in pancreatic beta-cells are regulated by intracellular ATP, *Pflugers Arch.* 405, 305–309.
83. Rorsman, P., and Trube, G. (1986) Calcium and delayed potassium currents in mouse pancreatic beta-cells under voltage-clamp conditions, *The Journal of Physiology* 374, 531–550.
84. Kelly, R. P., Sutton, R., and Ashcroft, F. M. (1991) Voltage-activated calcium and potassium currents in human pancreatic beta-cells, *The Journal of Physiology* 443, 175–192.
85. Cook, D. L., Ikeuchi, M., and Fujimoto, W. Y. (1984) Lowering of intracellular pH inhibits Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in pancreatic b-cells, *Nature* 311, 269–271.
86. Göpel, S., Kanno, T., Barg, S., Galvanovskis, J., and Rorsman, P. (1999) Voltage-gated and resting membrane currents recorded from B-cells in intact mouse pancreatic islets, *The Journal of Physiology* 521, 717–728.
87. Sturgess, N. C., Ashford, M. L., Cook, D. L., and Hales, C. N. (1985) The sulphonylurea receptor may be an ATP-sensitive potassium channel, *Lancet (London, England)* 2, 474–475.
88. Znkler, B. J., Lenzen, S., Manner, K., Panten, U., and Trube, G. (1988) Concentration-dependent effects of tolbutamide, meglitinide, glipizide, glibenclamide and diazoxide on ATP-regulated K<sup>+</sup> currents in pancreatic b-cells, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 337, 225–230.

89. Vasseur, M., Debuyser, A., and Joffre, M. (1987) Sensitivity of pancreatic beta cell to calcium channel blockers. An electrophysiologic study of verapamil and nifedipine, *Fundamental & clinical pharmacology* 1, 95–113.
90. Henquin, J. C. (2000) Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose, *Diabetes* 49, 1751–1760.
91. Gembal, M., Gilon, P., and Henquin, J. C. (1992) Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in mouse B cells, *The Journal of clinical investigation* 89, 1288–1295.
92. Sato, Y., Aizawa, T., Komatsu, M., Okada, N., and Yamada, T. (1992) Dual functional role of membrane depolarization/Ca<sup>2+</sup> influx in rat pancreatic B-cell, *Diabetes* 41, 438–443.
93. Panten, U., Schwanstecher, M., Wallasch, A., Lenzen, S. (1988) Glucose both inhibits and stimulates insulin secretion from isolated pancreatic islets exposed to maximally effective concentrations of sulfonylureas, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 338, 459–462.
94. Best, L., Yates, A. P., Tomlinson, S. (1992) Stimulation of insulin secretion by glucose in the absence of diminished potassium (86Rb<sup>+</sup>) permeability, *Biochemical pharmacology* 43, 2483–2485.
95. Sato, Y., Anello, M., and Henquin, J. C. (1999) Glucose regulation of insulin secretion independent of the opening or closure of adenosine triphosphate-sensitive K<sup>+</sup> channels in beta cells, *Endocrinology* 140, 2252–2257.
96. Jitrapakdee, S., Wutthisathapornchai, A., Wallace, J. C., and MacDonald, M. J. (2010) Regulation of insulin secretion: role of mitochondrial signalling, *Diabetologia* 53, 1019–1032.
97. Jensen, M. v., Joseph, J. W., Ronnebaum, S. M., Burgess, S. C., Sherry, A. D., and Newgard, C. B. (2008) Metabolic cycling in control of glucose-stimulated insulin secretion, *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 295, E1287-E1297.
98. Straub, S. G., and Sharp, G. W. G. (2002) Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion, *Diabetes/metabolism research and reviews* 18, 451–463.
99. Panten, U., Willenborg, M., Schumacher, K., Hamada, A., Ghaly, H., and Rustenbeck, I. (2013) Acute metabolic amplification of insulin secretion in mouse islets is mediated by mitochondrial export of metabolites, but not by mitochondrial energy generation, *Metabolism: clinical and experimental* 62, 1375–1386.

100. Panten, U., Früh, E., Reckers, K., and Rustenbeck, I. (2016) Acute metabolic amplification of insulin secretion in mouse islets: Role of cytosolic acetyl-CoA, *Metabolism: clinical and experimental* 65, 1225–1229.
101. Gembal, M., Detimary, P., Gilon, P., Gao, Z. Y., and Henquin, J. C. (1993) Mechanisms by which glucose can control insulin release independently from its action on adenosine triphosphate-sensitive K<sup>+</sup> channels in mouse B cells, *The Journal of clinical investigation* 91, 871–880.
102. Henquin, J. C., Ravier, M. A., Nenquin, M., Jonas, J. C., and Gilon, P. (2003) Hierarchy of the beta-cell signals controlling insulin secretion, *European journal of clinical investigation* 33, 742–750.
103. Gilon, P., and Henquin, J. C. (2001) Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function, *Endocrine reviews* 22, 565–604.
104. Jones, P. M., and Persaud, S. J. (1998) Protein kinases, protein phosphorylation, and the regulation of insulin secretion from pancreatic beta-cells, *Endocrine reviews* 19, 429–461.
105. Fujimoto, K., Shibasaki, T., Yokoi, N., Kashima, Y., Matsumoto, M., Sasaki, T., Tajima, N., Iwanaga, T., and Seino, S. (2002) Piccolo, a Ca<sup>2+</sup> sensor in pancreatic beta-cells. Involvement of cAMP-GEFII.Rim2. Piccolo complex in cAMP-dependent exocytosis, *The Journal of biological chemistry* 277, 50497–50502.
106. Gromada, J., Holst, J. J., and Rorsman, P. (1998) Cellular regulation of islet hormone secretion by the incretin hormone glucagon-like peptide 1, *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 435, 583–594.
107. Owerbach, D., Bell, G. I., Rutter, W. J., Brown, J. A., and Shows, T. B. (1981) The Insulin Gene Is Located on the Short Arm of Chromosome 11 in Humans, *Diabetes* 30, 267–270.
108. Dodson, G., and Steiner, D. (1998) The role of assembly in insulin's biosynthesis, *Current Opinion in Structural Biology* 8, 189–194.
109. Haataja, L., Snapp, E., Wright, J., Liu, M., Hardy, A. B., Wheeler, M. B., Markwardt, M. L., Rizzo, M., and Arvan, P. (2013) Proinsulin intermolecular interactions during secretory trafficking in pancreatic  $\beta$  cells, *The Journal of biological chemistry* 288, 1896–1906.



110. Orci, L., Ravazzola, M., Amherdt, M., Perrelet, A., Powell, S. K., Quinn, D. L., and Moore, H. P. (1987) The trans-most cisternae of the Golgi complex: a compartment for sorting of secretory and plasma membrane proteins, *Cell* 51, 1039–1051.
111. Hou, J. C., Min, L., and Pessin, J. E. (2009) Chapter 16 Insulin Granule Biogenesis, Trafficking and Exocytosis. In *Vitamins and hormones* (Litwack, G., Ed.), 1st ed., pp 473–506, Academic Press, Amsterdam, Oxford.
112. Rhodes, C. J., and Halban, P. A. (1987) Newly synthesized proinsulin/insulin and stored insulin are released from pancreatic B cells predominantly via a regulated, rather than a constitutive, pathway, *The Journal of cell biology* 105, 145–153.
113. Saito, M., and Shiba, Y. (2019) ER Stress, Secretory Granule Biogenesis, and Insulin. In *Ultimate Guide to Insulin* (Zaman, G., Ed.), pp 37–56, IntechOpen.
114. Tooze, S. A., Martens, G. J. M., Huttner, W. B. (2001) Secretory granule biogenesis: rafting to the SNARE, *Trends in Cell Biology* 11, 116–122.
115. Molinete, M., Irminger, J. C., Tooze, S. A., and Halban, P. A. (2000) Trafficking/sorting and granule biogenesis in the beta-cell, *Seminars in cell & developmental biology* 11, 243–251.
116. Huang, X. F., and Arvan, P. (1994) Formation of the insulin-containing secretory granule core occurs within immature beta-granules, *The Journal of biological chemistry* 269, 20838–20844.
117. Dunn, M. F. (2005) Zinc-ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer - a review, *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 18, 295–303.
118. Rhodes, C. J., Lucas, C. A., Mutkoski, R. L., Orci, L., and Halban, P. A. (1987) Stimulation by ATP of proinsulin to insulin conversion in isolated rat pancreatic islet secretory granules. Association with the ATP-dependent proton pump, *The Journal of biological chemistry* 262, 10712–10717.
119. L Orci, M Ravazzola, M Amherdt, O Madsen, A Perrelet, J D Vassalli, R G Anderson (1986) Conversion of proinsulin to insulin occurs coordinately with acidification of maturing secretory vesicles, *The Journal of cell biology* 103, 2273–2281.

120. Davidson, H. W., Rhodes, C. J., and Hutton, J. C. (1988) Intraorganellar calcium and pH control proinsulin cleavage in the pancreatic beta cell via two distinct site-specific endopeptidases, *Nature* 333, 93–96.
121. Dean, P. M. (1973) Ultrastructural morphometry of the pancreatic beta-cell, *Diabetologia* 9, 115–119.
122. Hill, C. P., Dauter, Z., Dodson, E. J., Dodson, G. G., and Dunn, M. F. (1991) X-ray structure of an unusual  $\text{Ca}^{2+}$  site and the roles of  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  in the assembly, stability, and storage of the insulin hexamer, *Biochemistry* 30, 917–924.
123. Sladek, R., Rocheleau, G., Rung, J., Dina, C., Shen, L., Serre, D., Boutin, P., Vincent, D., Belisle, A., Hadjadj, S., Balkau, B., Heude, B., Charpentier, G., Hudson, T. J., Montpetit, A., Pshezhetsky, A. V., Prentki, M., Posner, B. I., Balding, D. J., Meyre, D., Polychronakos, C., and Froguel, P. (2007) A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes, *Nature* 445, 881–885.
124. Chimienti, F., Devergnas, S., Favier, A., and Seve, M. (2004) Identification and Cloning of a beta-Cell-Specific Zinc Transporter, ZnT-8, Localized Into Insulin Secretory Granules, *Diabetes* 53, 2330–2337.
125. Chimienti, F., Devergnas, S., Pattou, F., Schuit, F., Garcia-Cuenca, R., Vandewalle, B., Kerr-Conte, J., van Lommel, L., Grunwald, D., Favier, A., and Seve, M. (2006) In vivo expression and functional characterization of the zinc transporter ZnT8 in glucose-induced insulin secretion, *Journal of cell science* 119, 4199–4206.
126. Orci, L., Ravazzola, M., Amherdt, M., Madsen, O., Vassalli, J. D., and Perrelet, A. (1985) Direct identification of prohormone conversion site in insulin-secreting cells, *Cell* 42, 671–681.
127. Feng, L., and Arvan, P. (2003) The trafficking of alpha 1-antitrypsin, a post-Golgi secretory pathway marker, in INS-1 pancreatic beta cells, *The Journal of biological chemistry* 278, 31486–31494.
128. Zhu, X., Hu, R., Brissova, M., Stein, R. W., Powers, A. C., Gu, G., and Kaverina, I. (2015) Microtubules Negatively Regulate Insulin Secretion in Pancreatic  $\beta$  Cells, *Developmental cell* 34, 656–668.
129. Wang, Z., and Thurmond, D. C. (2009) Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis - roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins, *Journal of cell science* 122, 893–903.

130. Gerber, S. H., and Südhof, T. C. (2002) Molecular determinants of regulated exocytosis, *Diabetes* 51, S3-S11.
131. Heinemann, C., Chow, R. H., Neher, E., and Zucker, R. S. (1994) Kinetics of the secretory response in bovine chromaffin cells following flash photolysis of caged  $\text{Ca}^{2+}$ , *Biophysical journal* 67, 2546–2557.
132. Liu, Y., and Edwards, R. H. (1997) The role of vesicular transport proteins in synaptic transmission and neural degeneration, *Annual review of neuroscience* 20, 125–156.
133. Suszkiw, J. B., and Whittaker, V. P. (1979) Role of Vesicle Recycling in Vesicular Storage and Release of Acetylcholine in Torpedo Electropaque Synapses. In *The Cholinergic Synapse. International Symposium : Papers and abstracts*, pp 153–162, Elsevier.
134. Simpson, J. A. (1969) THE RELEASE OF NEURAL TRANSMITTER SUBSTANCES, *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 32, 638.
135. Klenchin, V. A., and Martin, T. F. (2000) Priming in exocytosis: attaining fusion-competence after vesicle docking, *Biochimie* 82, 399–407.
136. Fasshauer, D., Sutton, R. B., Brunger, A. T., and Jahn, R. (1998) Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 15781–15786.
137. Söllner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., and Rothman, J. E. (1993) SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion, *Nature* 362, 318–324.
138. Fernandez, I., Ubach, J., Dulubova, I., Zhang, X., Südhof, T. C., and Rizo, J. (1998) Three-Dimensional Structure of an Evolutionarily Conserved N-Terminal Domain of Syntaxin 1A, *Cell* 94, 841–849.
139. Oyler GA1, Higgins GA, Hart RA, Battenberg E, Billingsley M, Bloom FE, Wilson MC. (1989) The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations, *The Journal of cell biology* 109, 3039–3052.
140. Trimble, W. S., Cowan, D. M., and Scheller, R. H. (1988) VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 4538–4542.

141. Dulubova, I., Sugita, S., Hill, S., Hosaka, M., Fernandez, I., Südhof, T. C., and Rizo, J. (1999) A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18, *The EMBO journal* 18, 4372–4382.
142. Pevsner, J., Hsu, S. C., and Scheller, R. H. (1994) n-Sec1: a neural-specific syntaxin-binding protein, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 1445–1449.
143. Verhage, M., Maia, A. S., Plomp, J. J., Brussaard, A. B., Heeroma, J. H., Vermeer, H., Toonen, R. F., Hammer, R. E., van den Berg, T. K., Missler, M., Geuze, H. J., and Südhof, T. C. (2000) Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion, *Science (New York, N.Y.)* 287, 864–869.
144. Oh, E., Kalwat, M. A., Kim, M.-J., Verhage, M., and Thurmond, D. C. (2012) Munc18-1 regulates first-phase insulin release by promoting granule docking to multiple syntaxin isoforms, *The Journal of biological chemistry* 287, 25821–25833.
145. Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R., and Brunger, A. T. (1998) Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution, *Nature* 395, 347–353.
146. Hayashi, T., McMahon, H., Yamasaki, S., Binz, T., Hata, Y., Südhof, T. C., and Niemann, H. (1994) Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly, *The EMBO journal* 13, 5051–5061.
147. Jahn, R., and Südhof, T. C. (1999) Membrane fusion and exocytosis, *Annual review of biochemistry* 68, 863–911.
148. Tang, J., Maximov, A., Shin, O.-H., Dai, H., Rizo, J., and Südhof, T. C. (2006) A complexin/syntaxin 1 switch controls fast synaptic vesicle exocytosis, *Cell* 126, 1175–1187.
149. Südhof, T. C., and Rizo, J. (1996) Synaptotagmins: C2-domain proteins that regulate membrane traffic, *Neuron* 17, 379–388.
150. Geppert, M., Goda, Y., Hammer, R. E., Li, C., Rosahl, T. W., Stevens, C. F., and Südhof, T. C. (1994) Synaptotagmin I: a major Ca<sup>2+</sup> sensor for transmitter release at a central synapse, *Cell* 79, 717–727.

151. Ullrich, B., Li, C., Zhang, J. Z., McMahon, H., Anderson, R. G.W., Geppert, M., and Südhof, T. C. (1994) Functional properties of multiple synaptotagmins in brain, *Neuron* 13, 1281–1291.
152. Sugita, S., Han, W., Butz, S., Liu, X., Fernández-Chacón, R., Lao, Y., and Südhof, T. C. (2001) Synaptotagmin VII as a plasma membrane Ca(2+) sensor in exocytosis, *Neuron* 30, 459–473.
153. Nagamatsu, S., Nakamichi, Y., Yamamura, C., Matsushima, S., Watanabe, T., Ozawa, S., Furukawa, H., and Ishida, H. (1999) Decreased expression of t-SNARE, syntaxin 1, and SNAP-25 in pancreatic beta-cells is involved in impaired insulin secretion from diabetic GK rat islets: restoration of decreased t-SNARE proteins improves impaired insulin secretion, *Diabetes* 48, 2367–2373.
154. Sadoul, K., Lang, J., Montecucco, C., Weller, U., Regazzi, R., Catsicas, S., Wollheim, C. B., and Halban, P. A. (1995) SNAP-25 is expressed in islets of Langerhans and is involved in insulin release, *The Journal of cell biology* 128, 1019–1028.
155. Jacobsson, G., Bean, A. J., Scheller, R. H., Juntti-Berggren, L., Deeney, J. T., Berggren, P. O., and Meister, B. (1994) Identification of synaptic proteins and their isoform mRNAs in compartments of pancreatic endocrine cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 12487–12491.
156. Wu, B., Wei, S., Petersen, N., Ali, Y., Wang, X., Bacaj, T., Rorsman, P., Hong, W., Südhof, T. C., and Han, W. (2015) Synaptotagmin-7 phosphorylation mediates GLP-1-dependent potentiation of insulin secretion from  $\beta$ -cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 9996–10001.
157. Gaisano, H. Y. (2014) Here come the newcomer granules, better late than never, *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 25, 381–388.
158. Zhu, D., Zhang, Y., Lam, P. P. L., Dolai, S., Liu, Y., Cai, E. P., Choi, D., Schroer, S. A., Kang, Y., Allister, E. M., Qin, T., Wheeler, M. B., Wang, C.-C., Hong, W.-J., Woo, M., and Gaisano, H. Y. (2012) Dual role of VAMP8 in regulating insulin exocytosis and islet  $\beta$  cell growth, *Cell metabolism* 16, 238–249.
159. Zhu, D., Koo, E., Kwan, E., Kang, Y., Park, S., Xie, H., Sugita, S., and Gaisano, H. Y. (2013) Syntaxin-3 regulates newcomer insulin granule exocytosis and compound fusion in pancreatic beta cells, *Diabetologia* 56, 359–369.

160. Qin, T., Liang, T., Zhu, D., Kang, Y., Xie, L., Dolai, S., Sugita, S., Takahashi, N., Ostenson, C.-G., Banks, K., and Gaisano, H. Y. (2017) Munc18b Increases Insulin Granule Fusion, Restoring Deficient Insulin Secretion in Type-2 Diabetes Human and Goto-Kakizaki Rat Islets with Improvement in Glucose Homeostasis, *EBioMedicine* 16, 262–274.
161. Pimenta, W. (1995) Pancreatic Beta-Cell Dysfunction as the Primary Genetic Lesion in NIDDM, *JAMA* 273, 1855–1861.
162. Grodsky, G. M., Curry, D., Landahl, H., and Bennett, L. (1969) [Further studies on the dynamic aspects of insulin release in vitro with evidence for a two-compartmental storage system], *Acta Diabetol Lat 6 Suppl 1*, 554–578.
163. Rorsman, P., and Renstrom, E. (2003) Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells, *Diabetologia* 46, 1029–1045.
164. Göpel, S., Zhang, Q., Eliasson, L., Ma, X.-S., Galvanovskis, J., Kanno, T., Salehi, A., and Rorsman, P. (2004) Capacitance measurements of exocytosis in mouse pancreatic alpha-, beta- and delta-cells within intact islets of Langerhans, *The Journal of Physiology* 556, 711–726.
165. Fish, K. N. (2009) Total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy, *Current protocols in cytometry Chapter 12*, Unit12.18.
166. Ohara-Imaizumi, M., Nishiwaki, C., Kikuta, T., Nagai, S., Nakamichi, Y., and Nagamatsu, S. (2004) TIRF imaging of docking and fusion of single insulin granule motion in primary rat pancreatic beta-cells: different behaviour of granule motion between normal and Goto-Kakizaki diabetic rat beta-cells, *The Biochemical journal* 381, 13–18.
167. Seino, S., Shibasaki, T., and Minami, K. (2011) Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes, *The Journal of clinical investigation* 121, 2118–2125.
168. Matz, M., Schumacher, K., Hatlapatka, K., Lorenz, D., Baumann, K., and Rustenbeck, I. (2014) Observer-independent quantification of insulin granule exocytosis and pre-exocytotic mobility by TIRF microscopy, *Microscopy and microanalysis : the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada* 20, 206–218.
169. Hatlapatka, K., Matz, M., Schumacher, K., Baumann, K., and Rustenbeck, I. (2011) Bidirectional insulin granule turnover in the submembrane space during K(+) depolarization-induced secretion, *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 12, 1166–1178.

170. Schumacher, K., Matz, M., Bruning, D., Baumann, K., and Rustenbeck, I. (2015) Granule mobility, fusion frequency and insulin secretion are differentially affected by insulinotropic stimuli, *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 16, 493–509.
171. Miyazaki, J.-I., Araki, K., Yamato, E., Ikegami, H., Asano, T., Shibasaki, Y., Oka, Y., Yamamura, K.-I. (1990) Establishment of a Pancreatic beta-Cell Line That Retains Glucose-Inducible Insulin Secretion: Special Reference to Expression of Glucose Transporter Isoforms, *Endocrinology* 127, 126–132.
172. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5, *The Journal of general virology* 36, 59–74.
173. NCBI\_Iran Cat# C559, RRID:CVCL\_9804.
174. Riedl, J., Crevenna, A. H., Kessenbrock, K., Yu, J. H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T. A., Werb, Z., Sixt, M., and Wedlich-Soldner, R. (2008) Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin, *Nature methods* 5, 605–607.
175. Tantama, M., Martínez-François, J. R., Mongeon, R., and Yellen, G. (2013) Imaging energy status in live cells with a fluorescent biosensor of the intracellular ATP-to-ADP ratio, *Nature communications* 4, 2550.
176. Watkins, S., Geng, X., Li, L., Papworth, G., Robbins, P. D., and Drain, P. (2002) Imaging Secretory Vesicles by Fluorescent Protein Insertion in Propeptide Rather Than Mature Secreted Peptide, *Traffic* 3, 461–471.
177. Tsien RY, Rink TJ, Poenie M Measurement of cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths. 1985.
178. Di Virgilio, F., Steinberg, T.H., and Silverstein, S.C. (1990) Inhibition of Fura-2 sequestration and secretion with organic anion transport blockers, *Cell Calcium* 11, 57–62.
179. Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. (1985) A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties, *The Journal of biological chemistry* 260, 3440–3450.
180. Berg, J., Hung, Y. P., and Yellen, G. (2009) A genetically encoded fluorescent reporter of ATP:ADP ratio, *Nature methods* 6, 161–166.

181. Meglasson, M. D., Nelson, J., Nelson, D., and Erecinska, M. (1989) Bioenergetic response of pancreatic islets to stimulation by fuel molecules, *Metabolism* 38, 1188–1195.
182. Mörikofer-Zwez, S., and Walter, P. (1989) Binding of ADP to rat liver cytosolic proteins and its influence on the ratio of free ATP/free ADP, *Biochem. J.* 259, 117–124.
183. Tantama, M., and Yellen, G. (2014) Imaging changes in the cytosolic ATP-to-ADP ratio, *Methods in enzymology* 547, 355–371.
184. Michael, D. J., Geng, X., Cawley, N. X., Loh, Y. P., Rhodes, C. J., Drain, P., and Chow, R. H. (2004) Fluorescent cargo proteins in pancreatic beta-cells: design determines secretion kinetics at exocytosis, *Biophysical journal: Biophysical Letters* 87, L03-L05.
185. Henquin, J.-C., Mourad, N. I., and Nenquin, M. (2012) Disruption and stabilization of  $\beta$ -cell actin microfilaments differently influence insulin secretion triggered by intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization or store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry, *FEBS letters* 586, 89–95.
186. Mourad, N. I., Nenquin, M., and Henquin, J.-C. (2010) Metabolic amplifying pathway increases both phases of insulin secretion independently of beta-cell actin microfilaments, *American journal of physiology. Cell physiology* 299, C389-C398.
187. Tsuboi, T., da Silva-Xavier, G., Leclerc, I., Rutter, G. A. (2003) 5' AMP-activated protein kinase controls insulin-containing secretory vesicle dynamics, *J. Biol. Chem.* 278, 52042–52051.
188. Aunis, D., Bader, M.-F. (1988) The cytoskeleton as a barrier to exocytosis in secretory cells, *J. exp. Biol* 139, 253–266.
189. Kalwat, M. A., and Thurmond, D. C. (2013) Signaling mechanisms of glucose-induced F-actin remodeling in pancreatic islet  $\beta$  cells, *Experimental & molecular medicine* 45, e37.
190. Li, G., Rungger-Brändle, E., Just, I., Jonas, J. C., Aktories, K., and Wollheim, C. B. (1994) Effect of disruption of actin filaments by Clostridium botulinum C2 toxin on insulin secretion in HIT-T15 cells and pancreatic islets, *MBoC* 5, 1199–1213.
191. Jewell, J. L., Luo, W., Oh, E., Wang, Z., and Thurmond, D. C. (2008) Filamentous actin regulates insulin exocytosis through direct interaction with Syntaxin 4, *The Journal of biological chemistry* 283, 10716–10726.



192. Tomas, A., Yermen, B., Le Min, Pessin, J. E., and Halban, P. A. (2006) Regulation of pancreatic beta-cell insulin secretion by actin cytoskeleton remodelling: role of gelsolin and cooperation with the MAPK signalling pathway, *Journal of cell science* 119, 2156–2167.
193. Hauge-Evans, A. C., Squires, P. E., Persaud, S. J., and Jones, P. M. (1999) Pancreatic beta-cell-to-beta-cell interactions are required for integrated responses to nutrient stimuli: enhanced  $\text{Ca}^{2+}$  and insulin secretory responses of MIN6 pseudoislets, *Diabetes* 48, 1402–1408.
194. Luther, M. J., Hauge-Evans, A., Souza, K. L. A., Jörns, A., Lenzen, S., Persaud, S. J., and Jones, P. M. (2006) MIN6 beta-cell-beta-cell interactions influence insulin secretory responses to nutrients and non-nutrients, *Biochemical and biophysical research communications* 343, 99–104.
195. Lernmark, A. (1974) The preparation of, and studies on, free cell suspensions from mouse pancreatic islets, *Diabetologia* 10, 431–438.
196. Halban, P. A., Wollheim, C. B., Blondel, B., Meda, P., Niesor, E. N., and Mintz, D. H. (1982) The possible importance of contact between pancreatic islet cells for the control of insulin release, *Endocrinology* 111, 86–94.
197. Hopcroft, D. W., Mason, D. R., and Scott, R. S. (1985) Structure-function relationships in pancreatic islets: support for intraislet modulation of insulin secretion, *Endocrinology* 117, 2073–2080.
198. Straub, S. G., and Sharp, G. W. G. (2004) Hypothesis: one rate-limiting step controls the magnitude of both phases of glucose-stimulated insulin secretion, *American journal of physiology. Cell physiology* 287, C565-C571.
199. Gilon, P., Jonas, J. C., and Henquin, J. C. (1994) Culture duration and conditions affect the oscillations of cytoplasmic calcium concentration induced by glucose in mouse pancreatic islets, *Diabetologia* 37, 1007–1014.
200. Jonkers, F. C., Jonas, J.-C., Gilon, P., and Henquin, J.-C. (1999) Influence of cell number on the characteristics and synchrony of  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in clusters of mouse pancreatic islet cells, *The Journal of Physiology* 520, 839–849.
201. Stožer, A., Gosak, M., Dolensšek, J., Perc, M., Marhl, M., Rupnik, M. S., and Korošak, D. (2013) Functional connectivity in islets of Langerhans from mouse pancreas tissue slices, *PLoS computational biology* 9, e1002923.

202. Ravier, M. A., Guldenagel, M., Charollais, A., Gjinovci, A., Caille, D., Sohl, G., Wollheim, C. B., Willecke, K., Henquin, J.-C., and Meda, P. (2005) Loss of Connexin36 Channels Alters -Cell Coupling, Islet Synchronization of Glucose-Induced Ca<sup>2+</sup> and Insulin Oscillations, and Basal Insulin Release, *Diabetes* 54, 1798–1807.
203. Kelly, C., Guo, H., McCluskey, J. T., Flatt, P. R., and McClenaghan, N. H. (2010) Comparison of insulin release from MIN6 pseudoislets and pancreatic islets of Langerhans reveals importance of homotypic cell interactions, *Pancreas* 39, 1016–1023.
204. Michael, D. J., Ritzel, R. A., Haataja, L., and Chow, R. H. (2006) Pancreatic -Cells Secrete Insulin in Fast- and Slow-Release Forms, *Diabetes* 55, 600–607.
205. Pouli, A. E., Emmanouilidou, E., Zhao, C., Wasmeier, C., Hutton, J. C., and Rutter, G. A. (1998) Secretory-granule dynamics visualized in vivo with a phogrin-green fluorescent protein chimera, *Biochem. J.* 333, 193–199.
206. Riahi, Y., Wikstrom, J. D., Bachar-Wikstrom, E., Polin, N., Zucker, H., Lee, M.-S., Quan, W., Haataja, L., Liu, M., Arvan, P., Cerasi, E., and Leibowitz, G. (2016) Autophagy is a major regulator of beta cell insulin homeostasis, *Diabetologia* 59, 1480–1491.
207. Hutton, J. C. (1989) The insulin secretory granule, *Diabetologia* 32, 271–281.
208. Gandasi, N. R., and Barg, S. (2014) Contact-induced clustering of syntaxin and munc18 docks secretory granules at the exocytosis site, *Nature communications* 5, 3914.
209. Ma, L., Bindokas, V. P., Kuznetsov, A., Rhodes, C., Hays, L., Edwardson, J. M., Ueda, K., Steiner, D. F., and Philipson, L. H. (2004) Direct imaging shows that insulin granule exocytosis occurs by complete vesicle fusion, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 9266–9271.
210. Ishikawa-Ankerhold, H. C., Ankerhold, R., and Drummen, G. P. C. (2012) Advanced fluorescence microscopy techniques--FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM, *Molecules (Basel, Switzerland)* 17, 4047–4132.
211. Ohara-Imaizumi, M., Nakamichi, Y., Tanaka, T., Ishida, H., and Nagamatsu, S. (2002) Imaging exocytosis of single insulin secretory granules with evanescent wave microscopy: distinct behavior of granule motion in biphasic insulin release, *The Journal of biological chemistry* 277, 3805–3808.

212. Shibasaki, T., Takahashi, H., Miki, T., Sunaga, Y., Matsumura, K., Yamanaka, M., Zhang, C., Tamamoto, A., Satoh, T., Miyazaki, J.-I., and Seino, S. (2007) Essential role of Epac2/Rap1 signaling in regulation of insulin granule dynamics by cAMP, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 19333–19338.
213. Gheni, G., Ogura, M., Iwasaki, M., Yokoi, N., Minami, K., Nakayama, Y., Harada, K., Hastoy, B., Wu, X., Takahashi, H., Kimura, K., Matsubara, T., Hoshikawa, R., Hatano, N., Sugawara, K., Shibasaki, T., Inagaki, N., Bamba, T., Mizoguchi, A., Fukusaki, E., Rorsman, P., and Seino, S. (2014) Glutamate acts as a key signal linking glucose metabolism to incretin/cAMP action to amplify insulin secretion, *Cell reports* 9, 661–673.
214. Dean, P. M. (1976) The kinetics of beta-granule formation: A morphometric study, *Diabetologia* 12, 111–114.
215. Schulze, T., Morsi, M., Reckers, K., Brüning, D., Seemann, N., Panten, U., and Rustenbeck, I. (2017) Metabolic amplification of insulin secretion is differentially desensitized by depolarization in the absence of exogenous fuels, *Metabolism: clinical and experimental* 67, 1–13.
216. Willenborg, M., Belz, M., Schumacher, K., Paufler, A., Hatlapatka, K., and Rustenbeck, I. (2012) Ca(2+)-dependent desensitization of insulin secretion by strong potassium depolarization, *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 303, E223–E233.
217. Belz, M., Willenborg, M., Gorgler, N., Hamada, A., Schumacher, K., and Rustenbeck, I. (2014) Insulinotropic effect of high potassium concentration beyond plasma membrane depolarization, *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 306, E697–E706.
218. Seino, S., Takahashi, H., Fujimoto, W., and Shibasaki, T. (2009) Roles of cAMP signalling in insulin granule exocytosis, *Diabetes, obesity & metabolism* 11, 180–188.
219. Nofal, S., Becherer, U., Hof, D., Matti, U., and Rettig, J. (2007) Primed vesicles can be distinguished from docked vesicles by analyzing their mobility, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 1386–1395.
220. Mziaut, H., Mulligan, B., Hoboth, P., Otto, O., Ivanova, A., Herbig, M., Schumann, D., Hildebrandt, T., Dehghany, J., Sonmez, A., Munster, C., Meyer-Hermann, M., Guck, J., Kalaidzidis, Y., and Solimena, M. (2016) The F-actin modifier villin regulates insulin granule

dynamics and exocytosis downstream of islet cell autoantigen 512, *Molecular metabolism* 5, 656–668.

221. Duncan, R. R., Greaves, J., Wiegand, U. K., Matskevich, I., Bodammer, G., Apps, D. K., Shipston, M. J., and Chow, R. H. (2003) Functional and spatial segregation of secretory vesicle pools according to vesicle age, *Nature* 422, 176–180.

222. Ivanova, A., Kalaidzidis, Y., Dirkx, R., Sarov, M., Gerlach, M., Schroth-Diez, B., Muller, A., Liu, Y., Andree, C., Mulligan, B., Munster, C., Kurth, T., Bickle, M., Speier, S., Anastassiadis, K., and Solimena, M. (2013) Age-dependent labeling and imaging of insulin secretory granules, *Diabetes* 62, 3687–3696.

223. Hoboth, P., Muller, A., Ivanova, A., Mziaut, H., Dehghany, J., Sonmez, A., Lachnit, M., Meyer-Hermann, M., Kalaidzidis, Y., and Solimena, M. (2015) Aged insulin granules display reduced microtubule-dependent mobility and are disposed within actin-positive multigranular bodies, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, E667-E676.

224. Hoboth, P., Muller, A., Ivanova, A., Mziaut, H., Dehghany, J., Sonmez, A., Lachnit, M., Meyer-Hermann, M., Kalaidzidis, Y., and Solimena, M. (2015) Correction for Hoboth et al., Aged insulin granules display reduced microtubule-dependent mobility and are disposed within actin-positive multigranular bodies, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, E2114.

225. Schatz, H., Nierle, C., and Pfeiffer, E. F. (1975) (Pro-) insulin biosynthesis and release of newly synthesized (pro-) insulin from isolated islets of rat pancreas in the presence of amino acids and sulphonylureas, *European journal of clinical investigation* 5, 477–485.

226. Gold, G., Gishizky, M., and Grodsky, G. (1982) Evidence that glucose "marks" beta cells resulting in preferential release of newly synthesized insulin, *Science* 218, 56–58.

227. Halban, P. A. (1982) Differential rates of release of newly synthesized and of stored insulin from pancreatic islets, *Endocrinology* 110, 1183–1188.

228. Takahashi, N., Kishimoto, T., Nemoto, T., Kadowaki, T., and Kasai, H. (2002) Fusion pore dynamics and insulin granule exocytosis in the pancreatic islet, *Science (New York, N.Y.)* 297, 1349–1352.

229. Collins, S. C., Do, H. W., Hastoy, B., Hugill, A., Adam, J., Chibalina, M. V., Galvanovskis, J., Godazgar, M., Lee, S., Goldsworthy, M., Salehi, A., Tarasov, A. I.,

- Rosengren, A. H., Cox, R., and Rorsman, P. (2016) Increased Expression of the Diabetes Gene SOX4 Reduces Insulin Secretion by Impaired Fusion Pore Expansion, *Diabetes* 65, 1952–1961.
230. Salomon D., and Meda P. (1986) Heterogeneity and contact-dependent regulation of hormone secretion by individual B cells, *Exp Cell Res* 162, 507–520.
231. Bavamian, S., Klee, P., Britan, A., Populaire, C., Caille, D., Cancela, J., Charollais, A., and Meda, P. (2007) Islet-cell-to-cell communication as basis for normal insulin secretion, *Diabetes, obesity & metabolism* 9, 118–132.
232. Chowdhury, A., Dyachok, O., Tengholm, A., Sandler, S., and Bergsten, P. (2013) Functional differences between aggregated and dispersed insulin-producing cells, *Diabetologia* 56, 1557–1568.
233. Low, J. T., Mitchell, J. M., Do, O. H., Bax, J., Rawlings, A., Zavortink, M., Morgan, G., Parton, R. G., Gaisano, H. Y., and Thorn, P. (2013) Glucose principally regulates insulin secretion in mouse islets by controlling the numbers of granule fusion events per cell, *Diabetologia* 56, 2629–2637.
234. Almaca, J., Liang, T., Gaisano, H. Y., Nam, H. G., Berggren, P.-O., and Caicedo, A. (2015) Spatial and temporal coordination of insulin granule exocytosis in intact human pancreatic islets, *Diabetologia* 58, 2810–2818.
235. Low, J. T., Zavortink, M., Mitchell, J. M., Gan, W. J., Do, O. H., Schwiening, C. J., Gaisano, H. Y., and Thorn, P. (2014) Insulin secretion from beta cells in intact mouse islets is targeted towards the vasculature, *Diabetologia* 57, 1655–1663.
236. Jo, J., Choi, M. Y., and Koh, D.-S. (2007) Size distribution of mouse Langerhans islets, *Biophysical journal* 93, 2655–2666.
237. Ämmälä, C., Eliasson, L., Bokvist, K., Larsson, O. (1993) Exocytosis elicited by action potentials and voltageclamp calcium currents in individual mouse pancreatic beta-cells., *Journal of Physiology* 472, 665–688.
238. Nesher, R., and Cerasi, E. (1987) Biphasic insulin release as the expression of combined inhibitory and potentiating effects of glucose, *Endocrinology* 121, 1017–1024.
239. Nesher, R., and Cerasi, E. (2002) Modeling phasic insulin release: immediate and time-dependent effects of glucose, *Diabetes* 51, S53–S59.

240. Nagamatsu, S. (2006) TIRF Microscopy Analysis of the Mechanism of Insulin Exocytosis, *Endocr J* 53, 433–440.
241. Ohara-Imaizumi, M., Fujiwara, T., Nakamichi, Y., Okamura, T., Akimoto, Y., Kawai, J., Matsushima, S., Kawakami, H., Watanabe, T., Akagawa, K., and Nagamatsu, S. (2007) Imaging analysis reveals mechanistic differences between first- and second-phase insulin exocytosis, *The Journal of cell biology* 177, 695–705.
242. Xie, L., Zhu, D., and Gaisano, H. Y. (2012) Role of mammalian homologue of *Caenorhabditis elegans* unc-13-1 (Munc13-1) in the recruitment of newcomer insulin granules in both first and second phases of glucose-stimulated insulin secretion in mouse islets, *Diabetologia* 55, 2693–2702.
243. Uenishi, E., Shibasaki, T., Takahashi, H., Seki, C., Hamaguchi, H., Yasuda, T., Tatebe, M., Oiso, Y., Takenawa, T., and Seino, S. (2013) Actin dynamics regulated by the balance of neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) and cofilin activities determines the biphasic response of glucose-induced insulin secretion, *The Journal of biological chemistry* 288, 25851–25864.
244. Ravier, M. A., Sehlin, J., and Henquin, J. C. (2002) Disorganization of cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations and pulsatile insulin secretion in islets from ob/ ob mice, *Diabetologia* 45, 1154–1163.
245. Stožer, A., Dolenšek, J., and Rupnik, M. S. (2013) Glucose-stimulated calcium dynamics in islets of Langerhans in acute mouse pancreas tissue slices, *PloS one* 8, e54638.
246. Henquin, J. C., Nenquin, M., Stiernet, P., Ahren, B. (2006) In Vivo and In Vitro Glucose-Induced Biphasic Insulin Secretion in the Mouse. Pattern and Role of Cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  and Amplification Signals in beta-cells, *Diabetes* 55, 441–451.
247. Hatlapatka, K., Wienbergen, A., Kühne, C., Jörns, A., Willenborg, M., and Rustenbeck, I. (2009) Selective enhancement of nutrient-induced insulin secretion by ATP-sensitive  $\text{K}^{+}$  channel-blocking imidazolines, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 331, 1033–1041.
248. Henquin, J.-C., Dufrane, D., Kerr-Conte, J., and Nenquin, M. (2015) Dynamics of glucose-induced insulin secretion in normal human islets, *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 309, E640-E650.

249. Caumo, A., and Luzi, L. (2004) First-phase insulin secretion: does it exist in real life? Considerations on shape and function, *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 287, E371-E385.
250. Del Prato, S., Marchetti, P., and Bonadonna, R. C. (2002) Phasic Insulin Release and Metabolic Regulation in Type 2 Diabetes, *Diabetes* 51, S109-S116.
251. (2018) 54th EASD Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes : Berlin, Germany, 1 - 5 October 2018, *Diabetologia* 61, 1–620.
252. Tompkins, L. S., Nullmeyer, K. D., Murphy, S. M., Weber, C. S., and Lynch, R. M. (2002) Regulation of secretory granule pH in insulin-secreting cells, *American journal of physiology. Cell physiology* 283, C429-C437.
253. Malaisse, W. J., Malaisse-Lagae, F., Walker, M. O., and Lacy, P. E. (1971) The Stimulus-secretion Coupling of Glucose-induced Insulin Release: V. The Participation of a Microtubular-microfilamentous System, *Diabetes* 20, 257–265.
254. Orci, L., Gabbay, K. H., and Malaisse, W. J. (1972) Pancreatic Beta-Cell Web: Its Possible Role in Insulin Secretion, *Science* 175, 1128–1130.
255. Thurmond, D. C., Gonelle-Gispert, C., Furukawa, M., Halban, P. A., and Pessin, J. E. (2003) Glucose-stimulated insulin secretion is coupled to the interaction of actin with the t-SNARE (target membrane soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor protein) complex, *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 17, 732–742.
256. Wilson, J. R., Ludowyke, R. I., and Biden, T. J. (2001) A redistribution of actin and myosin IIA accompanies Ca<sup>2+</sup>-dependent insulin secretion, *FEBS letters* 492, 101–106.
257. Nevins, A. K., and Thurmond, D. C. (2003) Glucose regulates the cortical actin network through modulation of Cdc42 cycling to stimulate insulin secretion, *American journal of physiology. Cell physiology* 285, C698-C710.
258. Spector, I., Braet, F., Shochet, N. R., and Bubb, M. R. (1999) New anti-actin drugs in the study of the organization and function of the actin cytoskeleton, *Microsc. Res. Tech.* 47, 18–37.
259. Coué, M., Brenner, S. L., Spector, I., and Korn, E. D. (1987) Inhibition of actin polymerization by latrunculin A, *FEBS letters* 213, 316–318.

260. Wulf, E., Deboen, A., Bautz, F. A., Faulstich, H., and Wieland, T. (1979) Fluorescent phalloxin, a tool for the visualization of cellular actin, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76, 4498–4502.
261. Melak, M., Plessner, M., and Grosse, R. (2017) Actin visualization at a glance, *Journal of cell science* 130, 525–530.
262. Melak, M., Plessner, M., and Grosse, R. (2017) Correction: Actin visualization at a glance, *Journal of cell science* 130, 1688.
263. Burkel, B. M., Dassow, G. von, and Bement, W. M. (2007) Versatile fluorescent probes for actin filaments based on the actin-binding domain of utrophin, *Cell motility and the cytoskeleton* 64, 822–832.
264. Schell, M. J., Erneux, C., and Irvine, R. F. (2001) Inositol 1,4,5-Trisphosphate 3-Kinase A Associates with F-actin and Dendritic Spines via Its N Terminus, *The Journal of biological chemistry* 276, 37537–37546.
265. Belin, B. J., Goins, L. M., and Mullins, R. D. (2014) Comparative analysis of tools for live cell imaging of actin network architecture, *Bioarchitecture* 4, 189–202.
266. Heaslip, A. T., Nelson, S. R., Lombardo, A. T., Beck Previs, S., Armstrong, J., and Warshaw, D. M. (2014) Cytoskeletal dependence of insulin granule movement dynamics in INS-1 beta-cells in response to glucose, *PloS one* 9, e109082.
267. Ding, W.-G., Kitasato, H. (1997) Suppressing Na<sup>+</sup> Influx Induces an Increase in Intracellular ATP Concentration in Mouse Pancreatic  $\beta$ -Cells, *Japanese Journal of Physiology* 47, 299–306.
268. Manfredi, G., Yang, L., Gajewski, C. D., Mattiazzi, M. (2002) Measurements of ATP in mammalian cells, *Methods* 26, 317–326.
269. Ainscow, E. K., and Rutter, G. A. (2001) Mitochondrial priming modifies Ca<sup>2+</sup> oscillations and insulin secretion in pancreatic islets, *Biochem. J.* 353, 175–180.
270. Ravier, M. A., and Rutter, G. A. (2005) Glucose or Insulin, but not Zinc Ions, Inhibit Glucagon Secretion From Mouse Pancreatic  $\beta$ -Cells, *Diabetes* 54, 1789–1797.
271. Rutter, G. A., Kennedy, H. J., Wood, C. D., White, M. R.H., and Tavaré, J. M. (1998) Real-time imaging of gene expression in single living cells, *Chemistry & Biology* 5, R285–R290.



272. Rajendran, M., Dane, E., Conley, J., and Tantama, M. (2016) Imaging Adenosine Triphosphate (ATP), *Biol. Bull.* 231, 73–84.
273. Imamura, H., Nhat, K. P., Togawa, H., Saito, K., Iino, R., Kato-Yamada, Y., Nagai, T., and Noji, H. (2009) Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 15651–15656.
274. Nakano, M., Imamura, H., Nagai, T., and Noji, H. (2011) Ca<sup>2+</sup> Regulation of Mitochondrial ATP Synthesis Visualized at the Single Cell Level, *ACS Chem. Biol.* 6, 709–715.
275. Tarasov, A. I., and Rutter, G. A. (2014) Use of genetically encoded sensors to monitor cytosolic ATP/ADP ratio in living cells, *Methods in enzymology* 542, 289–311.
276. Shepherd, R. M., and Henquin, J.-C. (1995) The Role of Metabolism, Cytoplasmic Ca<sup>2+</sup>, and pH-regulating Exchangers in Glucose-induced Rise of Cytoplasmic pH in Normal Mouse Pancreatic Islets, *The Journal of biological chemistry* 270, 7915–7921.
277. Varadi, A., and Rutter, G. A. (2004) Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in pancreatic islet beta-cells: critical evaluation of the use of endoplasmic reticulum-targeted "cameleons", *Endocrinology* 145, 4540–4549.
278. Tantama, M., Hung, Y. P., and Yellen, G. (2011) Imaging intracellular pH in live cells with a genetically encoded red fluorescent protein sensor, *Journal of the American Chemical Society* 133, 10034–10037.
279. Schulze, T., Morsi, M., Bruning, D., Schumacher, K., and Rustenbeck, I. (2016) Different responses of mouse islets and MIN6 pseudo-islets to metabolic stimulation: a note of caution, *Endocrine* 51, 440–447.
280. Conley, J. M., Radhakrishnan, S., Valentino, S. A., and Tantama, M. (2017) Imaging extracellular ATP with a genetically-encoded, ratiometric fluorescent sensor, *PloS one* 12, e0187481.

**Abkürzungsverzeichnis**

ABP	<i>actin binding protein</i>
Acety-CoA	Acetyl-CoenzymA
ADP	Adenosindiphosphat
AM	Acetoxymethylester
Aqua bidest.	<i>Aqua bidestillata</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCD	<i>charge-coupled device</i>
CPE	Carboxypeptidase E
DMEM	<i>Dulbecco 's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonucleinsäure)
DPSS	<i>diode pumped solid state</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N,N-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N,N-tetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
...RER	Raues Endoplasmatisches Retikulum
<u>FADH<sub>2</sub></u>	Flavin-Adenin-Dinucleotid (reduzierte Form)
F-Aktin	filamtöses Aktin
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
G-Aktin	globuläres Aktin
GFP	<i>green fluorescent protein</i> bzw grün fluoreszierendes Protein
...EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
...emGFP	<i>emerald green fluorescent protein</i>
Glc.	Glucose
GLP1	Glucagon-like peptide-1
GLUT	Glucose-Transporter
GTP	Guanosintriphosphat

HCl	<i>hydrochloric acid</i> bzw Salzsäure
HEK293	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hIns	humanes Insulin
ID	Identitäts-Nummer (für Granula)
K <sub>ATP</sub> -Kanal	ATP-abhängiger Kaliumkanal
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
K <sub>ir</sub>	(Kalium) <i>inward rectifier</i>
LB-Medium	<i>Lysogeny Broth-Medium</i>
L-Typ (Calciumkanal)	<i>longlasting</i> (langanhaltender Calciumstrom)
mCherry	monomeres (fluoreszierendes Protein)
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
MIN6	<i>mouse insulinoma, subclone 6</i>
mIns	murines Insulin
Munc	<i>mammalian uncoordinated-18</i>
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (reduzierte Form)
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NMRI	<i>Naval Medical Research Institute</i>
NSF	<i>soluble N-ethylmaleimide fusion protein</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> bzw. phosphatgepufferte Salzlösung
PC2	Prohormon Convertase
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PercevalHR	Perceval <i>High Range</i>
PP	pankreatisches Polypeptid
RhoGDI	(Rho) <i>GDP dissociation inhibitor</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonucleinsäure)
...mRNA	<i>messenger RNA</i>
ROI	<i>region of interest</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i> bzw Reaktive Sauerstoffspezies
RP	<i>reserve Pool</i>

RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RRP	<i>readily releasable Pool</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SM-Proteine	<i>Sec1/munc18-like proteins</i>
SNAP	<i>NSF attachment protein</i>
SNAP25	<i>synaptosomal-associated protein of 25 kDa</i>
SNARE	<i>NSF attachment proteins receptor</i>
t-SNARE	<i>target SNARE</i>
v-SNARE	<i>vesicle SNARE</i>
<u>SOC</u> -Medium	<i>super optimal broth with catabolite repression-Medium</i>
SUR1	<i>sulfonylurea receptor</i>
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TIFF	<i>tagged image file format</i>
tDimer	tandem Dimer
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
T1R	<i>taste receptor type 1</i>
TIRF	Totale-Interne-Reflexions-Fluoreszenz
TMRE	Tetramethylrodaminethylester
UCP	<i>uncoupling proteine</i>
VDCC	<i>voltage dependent calcium channel</i>
VAMP2	<i>vesicle associated membrane protein 2</i>
ZnT	Zink-Transporter

**Einheiten**

°C	Grad Celsius
g	Gramm
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
g	Erdbeschleunigung
kb	Kilobasen
L	Liter
...mL	Milliliter
...µL	Mikroliter
M	Molar (mol/L)
...mM	Millimolar
...µM	Mikromolar
m	Meter
cm	Centimeter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
nm	Nanometer
min	Minuten
mol	Mol ( $\triangleq 6,022 \cdot 10^{23}$ Teilchen)
mmol	mMol
µmol	µMol
N	Normal
Ω	Ohm
s	Sekunde
U	Units (Einheiten)
V	Volt
W	Watt
...mW	Milliwatt

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Theorie der Hypersekretion durch periphere Insulinresistenz .....	3
Abbildung 1.2: Theorie des Sekretionsdefekts der Beta-Zelle .....	5
Abbildung 1.3: Schematisches Modell der Stimulus-Sekretions-Kopplung in Beta-Zellen.....	8
Abbildung 1.4: Prozessierung des Proinsulins während der Reifung der Insulin-Granula.....	14
Abbildung 1.5: Modell der Granula-Exozytose .....	16
Abbildung 3.1: Durchlichtbild einer NMRI-Maus-Insel.....	30
Abbildung 3.2: Durchlichtbild einzelner Beta-Zellen und Zell-Clustern aus einer NMRI-Maus .....	32
Abbildung 3.3: Durchlichtbilder einzelner MIN6-Zellen (links) und einer MIN6-Pseudoinsel (rechts).....	33
Abbildung 3.4: Durchlichtbild einzelner AD293-Zellen .....	34
Abbildung 3.5: Ablaufschema für die Konstruktion neuer Vektor-Plasmide.....	41
Abbildung 3.6: Plasmidkarte von pEGFP-N1 / hIns-EGFP .....	45
Abbildung 3.7: Plasmidkarte von pEGFP-N1 / hIns-tDimer .....	46
Abbildung 3.8: Plasmidkarte von pAdlox / mIns-C-emGFP .....	47
Abbildung 3.9: Plasmidkarte von pAdlox / mIns-C-mCherry .....	48
Abbildung 3.10: Plasmidkarte von GW1 / PercevalHR.....	49
Abbildung 3.11: Plasmidkarte von pShuttle-CMV / hIns-EGFP .....	50
Abbildung 3.12: Plasmidkarte von pShuttle / CMV-mIns-C-emGFP .....	51
Abbildung 3.13: Plasmidkarte von pShuttle-CMV-Linker / PercevalHR.....	52
Abbildung 3.14: Plasmidkarte von pShuttle-CMV-Linker / tagRFP-T-Lifeact7.....	53
Abbildung 3.15: Ablaufschema für die Produktion neuer Adenoviren.....	56
Abbildung 3.16: Umströmungskammer für die TIRF-Mikroskopie.....	61
Abbildung 3.17: Kalibrierung der Cytosolischen Calcium-Konzentration.....	67
Abbildung 4.1: Einfluss von 40 mM KCl oder 30 mM Glucose auf die $[Ca^{2+}]_i$ von Pankreas-Inseln aus NMRI-Mäusen.....	79
Abbildung 4.2: Effekt von 40 mM KCl oder 30 mM Glucose auf die $[Ca^{2+}]_i$ einzelner Beta-Zellen und Einfluss von Zellkulturdauer und viraler Transduktion .....	81
Abbildung 4.3: Einfluss der Belichtung auf die $[Ca^{2+}]_i$ während der Aufnahme der Bildersequenzen im TIRF-Modus .....	82
Abbildung 4.4: Projektion zweier Fluoreszenzen aufeinander und Korrektur der Versatzes der Fluoreszenzbilder .....	83
Abbildung 4.5: Einfluss der Zielstruktur bei der Fluoreszenzmarkierung der Granula.....	84
Abbildung 4.6: Einfluss der fluoreszierenden Proteine bei der Fluoreszenzmarkierung der Granula .....	85
Abbildung 4.7: Transduzierte einzelne Beta-Zellen vor und nach einer TIRF-Mikroskopischen Messung (8 Sequenzen).....	88
Abbildung 4.8: Auswirkungen einer 50 minütigen Umströmung mit basaler Glucose (5 mM) auf die Granula im Submembranärraum von viral transduzierten Beta-Zellen.....	90
Abbildung 4.9: Berechnung der Nettowerte am Beispiel der Granula im ersten Bild.....	92

Abbildung 4.10: Mittelwerte aus den Nettowerten, der mit hIns-EGFP oder mIns-C-emGFP transduzierten Zellen .....	93
Abbildung 4.11: Insulinsekretion nach einer Erhöhung von KCl auf 40 mM oder einer Erhöhung der Glucose-Konzentration auf 30 mM bei 32 °C oder 37 °C.....	95
Abbildung 4.12: Einfluss schrittweise steigender Glucose-Konzentrationen auf die $[Ca^{2+}]_i$ von Beta-Zellen .....	98
Abbildung 4.13: Anzahl und Mobilität submembranärer Granula unter Einfluss schrittweise steigender Glucose-Konzentrationen .....	100
Abbildung 4.14: Mit tagRFP-T-Lifeact7 transduzierter Beta-Zellcluster (2 - 3 Zellen).....	102
Abbildung 4.15: Mit hIns-EGFP und tagRFP-T-Lifeact7 ko-transduzierte einzelne Beta-Zelle.....	103
Abbildung 4.16: Verteilung des Aktin-Zytoskeletts und der Insulin-Granula in einer einzelnen Beta-Zelle.....	104
Abbildung 4.17: Verteilung des Aktin-Zytoskeletts und der Insulin-Granula in einer Beta-Zelle innerhalb eines Zellclusters.....	106
Abbildung 4.18: Heterogenität des Aktin-Zytoskeletts in einzelnen, doppelt transduzierten Beta-Zellen .....	107
Abbildung 4.19: Lokalisation der submembranären Granula und des kortokalen Aktins unter basalen Bedingungen und während der stimulation mit 30 mM Glucose..	108
Abbildung 4.20: Lokalisation der submembranären Insulin-Granula im kortikalen Aktin-Netzwerk bei basaler Glucose-Konzentration (5 mM).....	109
Abbildung 4.21: Wirkung von Latrunculin auf Aktin-Zytoskelett und Insulin-Granula.....	111
Abbildung 4.22: Latrunculin-Wirkung auf das Aktin-Zytoskelett im Vergleich mit einem 15 mM Glucose-Stimulus.....	112
Abbildung 4.23: Einfluss eines 30 mM Glucose-Stimulus auf die ATP/ADP-Ratio in MIN6-Zellen.....	115
Abbildung 4.24: Heterogener Verlauf der ATP/ADP-Ratio in MIN6-Zellen nach verwendung eines 30 mM Glucose-Stimulus.....	117
Abbildung 4.25: Einfluss verschiedener Stimuli auf die ATP/ADP-Ratio in primären Beta-Zellen.....	119
Abbildung 4.26: Heterogener Verlauf der ATP/ADP-Ratio in Beta-Zellen nach Verwendung eines 30 mM Glucose-Stimulus.....	120
Abbildung 4.27: Verteilung der Mitochondrien und der Insulin-Granula in Beta-Zellen .....	122
Abbildung 5.1: Vergleich der $[Ca^{2+}]_i$ einzelner Beta-Zellen und MIN6-Zellen während der Stimulation mit 30 mM Glucose oder 40 mM KCl.....	127
Abbildung 5.2: Auswirkung der Belichtung im TIRF-Modus auf die Kontrollmessungen..	131
Abbildung 5.3: Einfluss der Transduktion der Beta-Zellen mit hIns-EGFP und tagRFP-Lifeact auf Anzahl und Mobilität der der Insulin-Granula im TIRF-Feld .....	142
Abbildung 5.4: Einfluss der Transduktionsmethode auf die Anzahl und Mobilität der im submembranären Raum detektierten Insulin-Granula primärer Beta-Zellen .....	145

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Chemikalien und Reagenzien .....	23
Tabelle 3.2: Zellkulturmedien .....	25
Tabelle 3.3: Enzyme für die Molekularbiologie .....	26
Tabelle 3.4: Konzentration der Salze in den Stammlösungen und in der Krebs-Ringer-Lösung .....	28
Tabelle 3.5: Herstellung $\text{Ca}^{2+}$ -freier Krebs-Ringer-Lösung .....	28
Tabelle 3.6: Bezeichnung und Erklärung der Granula-Parameter .....	75
Tabelle 4.1: Vergleich typischer Granula-Parameter bei basaler Glucose (5 mM), nach der Transduktion mit hIns-EGFP oder mIns-C-emGFP .....	89
Tabelle 5.1: Vergleich typischer Granula-Parameter in Beta-Zellen, die mit hIns-EGFP oder mIns-C-emGFP transduziert wurden, mit typischen Granula-Parametern aus MIN6-Zellen. Die Zellen wurden während der Messung mit 3 mM Glucose (MIN6-Zellen oder mit 5 mM Glucose (Beta-Zellen) umströmt. ....	130



## Formelverzeichnis

Formel 3.1: Berechnung der absoluten Calcium-Konzentration.....	68
Formel 3.2: Snellius'sches Gesetz .....	72